

Hybridisierungsexperimente mit wandlosen
Zellfragmenten von Acetabularia.

von

Marion Primke

Gießen 1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546305_0037

"There is something fascinating about science.
One gets such wholesale returns of conjecture
out of such a trifling investment of fact."

Mark Twain

Hybridisierungsexperimente mit wandlosen Zellfragmenten von Acetabularia.

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
vorgelegt dem Fachbereich Ernährungswissenschaft
der Justus-Liebig-Universität Gießen

von

Marion Primke

aus Woldegk

Gießen 1980



1. Berichterstatter: Prof. Dr. Hans-Georg Schweiger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Gertrud Rehner

Mündliche Prüfung: Dezember 1980

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Somatische Zellhybride	1
1.1.1 Entwicklung der somatischen Zellhybridisierung	1
1.1.2 Fusionierung tierischer Zellen	3
1.1.3 Fusionierung pflanzlicher Zellen	5
1.1.4 Aufbau biologischer Membranen	7
1.1.5 Mechanismus der Fusion	10
1.2 Protoplasten von Pflanzen	12
1.2.1 Zellwandaufbau	12
1.2.2 Isolierung von Protoplasten	16
1.3 Acetabularia	19
1.3.1 Ontogenie, Morphologie	19
1.3.2 Kern-Cytoplasma Wechselwirkungen in Acetabularia	22
1.3.2.1 Kernlose Zellfragmente	22
1.3.2.2 Transplantationsexperimente	23
1.3.2.3 Implantationsexperimente	24
2. Methoden und Material	26
2.1 Kultur der Algen	26
2.2 Gewinnung von "haploiden" Acetabularia Zellen	26
2.3 Protoplastenisolierung	28
2.3.1 Zellwandabbau in vitro	28

2.3.1.1	Zellwandisolierung von "normalen" Zellen	28
2.3.1.2	Reinigung und Aktivitätsbestimmung von β -Mannosidase aus Luzernensamen (<i>Medicago sativa</i>)	30
2.3.1.3	Abbau von isoliertem Zellwandmaterial mit Glykosidasen	31
2.3.2	Zellwandabbau in vivo	33
2.3.2.1	Abbau mit Glykosidasen	33
2.3.2.1.1	Pektinase und Zellulase	33
2.3.2.1.1.1	Methode nach Keller und Melchers (1973)	33
2.3.2.1.1.2	Methode nach Power und Cocking (1969)	34
2.3.2.1.2	β -Mannosidase aus Luzernensamen	35
2.3.2.1.3	β -Mannosidase und β -Glukosidase	35
2.3.2.1.4	β -Glukuronidase/Arylsulfatase	35
2.3.2.2	Isolierung von Protoplasten mit Hilfe von Papain aus "haploiden" Zellen	36
2.4	Präparation von Cytoplasten aus "normalen" Zellen	36
2.5	Fusionierung von Protoplasten, Cytoplasten und Karyoplasten	37
2.6	Aktivitätsuntersuchungen an "haploiden" Zellen und Cytoplasten von "normalen" <i>A. cliftonii</i>	38
2.6.1	Inkorporation von ^{35}S -Methionin in Cytoplasten von <i>A. cliftonii</i>	38
2.6.2	Inkorporation von $^{14}\text{CO}_2$ in Cytoplasten und "haploide" Zellen von <i>A. cliftonii</i>	39
2.7	Versuche zur Fusionierung von isolierten Kernen in vitro	40

2.7.1	Isolierung von Kernen aus "haploiden" Zellen von <i>A. cliftonii</i>	40
2.7.2	Versuche zur Fusionierung von isolierten Kernen	41
2.8	Methoden zur Überprüfung des Erfolges der Kernfusion	42
2.8.1	Implantation von Fusionsprodukten in kernlose Fragmente von <i>Acetabularia</i> Zellen	42
2.8.2	Elektronenmikroskopische Kontrolle	43
2.9	Mikroinjektion in Karyoplasten von <i>Acetabularia</i>	43
2.9.1	Mikroinjektion von RNA und DNA	43
2.9.2	Nachweis von Translationsprodukten der injizierten Nukleinsäuren	44
3.	Ergebnisse	46
3.1	Kultur der Algen	46
3.2	Protoplastenisolierung	47
3.2.1	Anwendung von Glykosidasen in vitro und in vivo	47
3.2.2	Anwendung von Papain	52
3.3	Fusionierung von Cytoplasten, Protoplasten und Karyoplasten	55
3.4	Aktivitätsuntersuchungen an Cytoplasten und "haploiden" Zellen von <i>A. cliftonii</i>	60
3.4.1	Metabolische Aktivität	60
3.4.2	Photosynthetische Aktivität	62

3.5	Versuche zur Fusionierung von isolierten Kernen aus "normalen" und "haploiden" Acetabularia	66
3.5.1	Methodische Versuche	66
3.5.2	Nachweis der Kernfusion	69
3.5.2.1	Aktivitätskontrolle in vivo	69
3.5.2.2	Elektronenmikroskopische Kontrolle	73
3.6	Mikroinjektion von Nukleinsäuren in isolierte Karyoplasten von Acetabularia	75
4.	Diskussion	80
4.1	Isolierung von Protoplasten	80
4.2	Fusionierung von Zellfragmenten	86
4.3	Versuche zur Fusionierung von isolierten Kernen	95
5.	Zusammenfassung	98
6.	Liste der Abkürzungen	100
7.	Literaturverzeichnis	101

1. Einleitung

1.1 Somatische Zellhybride

1.1.1 Entwicklung der somatischen Zellhybridisierung

Die ersten Zellfusionen unter kontrollierten Bedingungen wurden mit tierischen Zellen verschiedener Spezies von Harris und Watkins (1965) durchgeführt. Die Fusion erfolgte mit Hilfe von inaktivierten Sendai-Viren. Mit der Einführung der Fusionstechnik wurde eine große Zahl von zellbiologischen Fragestellungen experimentell angebar.

Hinweise auf die Möglichkeit, daß Zellen verschmelzen können, gab es schon im 19. Jahrhundert. So beobachtete Johannes Müller (1838), daß in Tumoren von Vertebraten multinukleäre Zellen vorkommen, Robin (1849) fand vielkernige Zellen im Knochenmark, Rokitansky (1855) in tuberkulösem Gewebe und Virchow (1858) in verschiedenen normalen und entzündeten Geweben. In klassischen Arbeiten berichtete Langhans (1868, 1870) über das Vorkommen von multinukleären Zellen. Von de Bary (1859) stammt der Hinweis, daß diese multinukleären Zellen durch Fusion mononukleärer Zellen entstanden seien. Es kann heute angenommen werden, daß die Entstehung multinukleärer Zellen in entzündeten Geweben zumindest in vielen Fällen durch Viren verursacht wurde, obwohl die virale Ätiologie erst viel später erkannt wurde. Luginbühl (1873) und Weigert (1874

beschrieben multinukleäre Zellen in Pockenbläschen und Warthin (1931) in den Mandeln von Masernpatienten.

Die erste Beobachtung von spontanen Zellfusionen in Gewebezellkulturen stammt von Lambert (1912). Warthin's Berichte veranlaßten Enders und Peebles (1954) den Effekt von Masernviren auf Gewebezellkulturen zu untersuchen. Diese Autoren kamen zu dem Schluß, daß durch Masernviren die Bildung von Syncytia induziert wird. Zu ähnlichen Resultaten kamen Henle et al. (1954) mit Mumpsvirus und Marston (1958) mit einem Virus der Parainfluenza Gruppe. Okada (1958, 1962) zeigte, daß die Zugabe hoher Konzentrationen von HVJ-Virus (Haemagglutinating Virus of Japan; dieses Virus ist identisch mit Sendai-Virus) in Gewebezellsuspensionen zur Bildung multinukleärer Zellen führt. Barski et al. (1960) beobachteten spontane Zellfusionen, wenn zwei verschiedene Mauszelllinien zusammen in Kultur gehalten wurden. Ephrussi (1962) führte umfangreiche karyologische Untersuchungen an diesen Zellhybriden durch und beobachtete unter anderem unspezifische Chromosomensegregation. Dieses Phänomen erwies sich inzwischen als geeignetes Mittel zur Genkartierung. Die Selektionierung von Zellhybriden anhand biochemischer Marker kann mit Hilfe einer von Littlefield (1964) entwickelten Methode durchgeführt werden.

1.1.2 Fusionierung tierischer Zellen

Fusionierung von Zellen höherer Tiere und damit die Bildung von Polykaryoplasten kann durch Infektion mit Herpes-, Paramyxo- oder Pockenviren induziert werden. Bei dem größten Teil der experimentellen Arbeiten wurde für die Zellfusion das zur Gruppe der Paramyxoviren gehörende Sendai-Virus in der inaktivierten Form eingesetzt (Harris et al., 1965; Davidson, 1969; Poste, 1978). Später konnte gezeigt werden, daß die Bildung funktionsfähiger Zellhybride auch durch Polyethyleneglycol (PEG) induziert werden kann (Pontecorvo, 1975). PEG erwies sich hinsichtlich der Handhabung, Aktivität und Reproduzierbarkeit dem inaktivierten Sendai-Virus als überlegen. Der weite Anwendungsbereich der Methode der Zellfusionierung wurde dadurch unterstrichen, daß es gelang, interspezifische Fusionen über einen weiten Bereich des Vertebraten Subphylums durchzuführen (Harris, 1970). Fibroblasten, Makrophagen, Lymphozyten und Erythrozyten und viele andere Zelltypen konnten untereinander und mit anderen Zelltypen fusioniert werden. Vielkernige Zellen können zwar mehrere Wochen leben, aber die fortdauernde Zellreproduktion hängt davon ab, daß einkernige Tochterzellen gebildet werden. Dieser Prozeß wird durch Kernfusion während der Mitose ermöglicht. Die Tochterzellen zeigen im Idealfall einen aus beiden Zelltypen bestehenden Chromosomensatz.

Hybride aus Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Fusion in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus befinden, werden in der Weise synchronisiert, daß die Phase von jenen Zellen determiniert wird, die sich zum Zeitpunkt der Fusion in der S Phase befinden. In Kernen der G1 Phase wird durch Gegenwart von Kernen der S Phase das Einsetzen der DNA-Synthese vorgezogen (Yanishevsky et al., 1978). Eine vorzeitige Chromosomenkondensation wird nach der Fusion von Mitose- und Interphasezellen beobachtet (Johnson und Rao, 1970).

Durch die Fusion von Zellen in unterschiedlichen Zellzyklusphasen wird die Identifikation von für die DNA-Synthese oder die Mitose essentiellen Faktoren ermöglicht. Die Zellfusion erlaubt so eine Analyse des Zellzyklus (Johnson und Rao, 1970; Rao und Johnson, 1972; Prescott, 1976).

In intraspezifischen Zellhybriden ist der Karyotyp bemerkenswert stabil, während in interspezifischen Zellhybriden im allgemeinen eine Chromosomensegregation stattfindet. Diese erfolgt zufällig und erfaßt nur ein Elterngenom. Bei Einsatz von Mutanten mit ausgeprägtem phänotypischen Charakter stellt die Chromosomensegregation ein geeignetes Mittel zur Genkartierung dar (Goss, 1978).

Mit Hilfe der Zellfusion kann auch die phänotypische Expression als Ausdruck der Regulation von Genexpression und der Zelldifferenzierung untersucht werden (Barski, 1970; Harris, 1970). Stark malignen Zellen wurde von Barski et al. (1960) in Zellhybriden ein dominanter Charakter zugeschrieben. Harris (1972) konnte dagegen eine Suppression der Malignität in ähnlichen Hybriden nachweisen. Die Elimination bestimmter Chromosomen resultierte jedoch in erneuter Malignität. Auf diese Weise kann die Suppression tumorinduzierender Faktoren einer genetischen Analyse unterworfen werden (Watkins, 1971).

1.1.3 Fusionierung pflanzlicher Zellen

Auch pflanzliche Zellen können fusioniert werden, allerdings erst nach Entfernen der Zellwand. Damit besteht auch im Bereich der pflanzlichen Taxa die Möglichkeit, genetisches Material verschiedener Herkunft parasexuell zu hybridisieren. Für die Pflanzenzüchtung könnte dies vor allem dadurch Bedeutung gewinnen, daß mit Hilfe der parasexuellen Hybridisierung von sexuell inkompatiblen Pflanzen spezifische Merkmale eingekreuzt werden und damit eine Erhöhung der genetischen Variabilität induziert wird.

Die ersten Fusionen pflanzlicher Protoplasten wurden von Küster (1909) beschrieben. Heute wird als Protoplast

der gesamte Zellinhalt ohne Zellwand bezeichnet.

Michel (1937) erweiterte Küster's Fusionsexperimente auf sechs Pflanzengenera und berichtete über die Bildung homo- und heterokaryotischer Fusionsprodukte. Die universelle Anwendung der Fusionstechnik erfolgte jedoch erst, nachdem es gelungen war, die Zellwände pflanzlicher Zellen durch enzymatischen Abbau zu entfernen und damit kontrolliert und auf einfache Weise Protoplasten zu isolieren (Cocking, 1960).

Bei den durch enzymatische Behandlung entstehenden Protoplasten werden häufig spontane Fusionen beobachtet, die über die expandierenden Plasmodesmata ablaufen. Diese Fusion erfolgt demzufolge intraspezifisch und ist von geringerem Interesse.

In Anlehnung an die Versuche von Küster (1909) konnten Power et al. (1970) die Fusion von Protoplasten unter kontrollierten Bedingungen mit Natriumnitrat induzieren. Eine immunologische Methode zur induzierten Fusionierung wurde von Hartmann et al. (1973) beschrieben. Keller und Melchers (1973) verwendeten Ca^{2+} zur Fusion pflanzlicher Protoplasten. Als ein wirksames Fusogen hat sich PEG auch bei pflanzlichen Zellen erwiesen (Kao und Michayluk, 1974). In diesem Falle wurde durch bivalente Kationen eine zusätzliche Erhöhung der Fusionsrate erzielt. Papahadjopoulos (1978) konnte die Bildung von animalischen Polykaryoplasten durch Ca^{2+} erreichen.

1.1.4 Aufbau biologischer Membranen.

Die Fusion biologischer Membranen steht in engem Zusammenhang mit Veränderungen, die sich in der Membranstruktur abspielen. Diese Veränderungen sind Gegenstand intensiver Untersuchungen. Dabei spielen Modellsysteme eine besondere Rolle. Ein solches Modellsystem stellen artifizielle Lipidvesikel (z.B. black lipid membranes) von definierter Zusammensetzung dar (Wilschut und Papahadjopoulos, 1979). Insbesondere die Anwendung biophysikalischer Meßtechniken (Nuclear magnetic resonance NMR; Differential scanning calorimetry DSC; Electron spin resonance ESR) hat zu einem vertieften Verständnis der Membranstruktur und des Fusionsmechanismus geführt (Chapman, 1975; Bergelson, 1978; Mabrey und Sturtevant, 1978).

Die gegenwärtigen Auffassungen vom Aufbau biologischer Membranen finden ihren Ausdruck im "fluid mosaic model" von Singer und Nicolson (1972) (Abb. 1). Dieses Grundkonzept scheint auf alle biologischen Membranen anwendbar zu sein, obwohl gravierende Unterschiede in der Lipid- und Proteinzusammensetzung sowie deren räumlicher Anordnung in den verschiedenen biologischen Membranen bestehen. Aus diesen Differenzen leiten sich unterschiedliche Fusionsbedingungen und Fusionsbereitschaft der

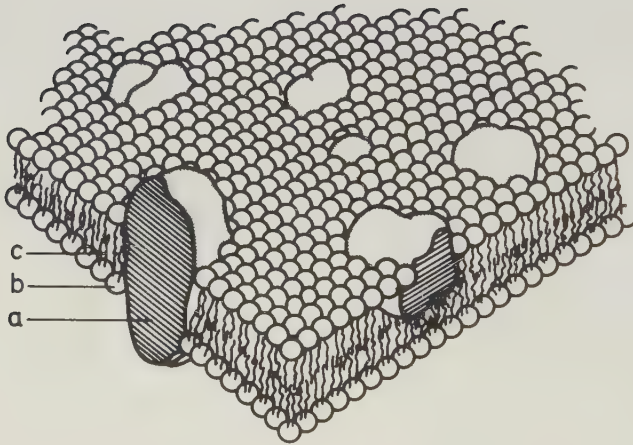


Abb. 1 "Fluid Mosaic Model" nach Singer und Nicolson (1972), a. interkalare, amphipatische Proteine, b. polare Gruppen und c. Fettsäureketten der Phospholipide.

verschiedenen Membranen ab.

Das "fluid mosaic model" basiert auf den thermodynamischen Eigenschaften der Membranen. Es beschreibt die Membran als Lipid-Doppelschicht mit interkalaren und peripheren amphipatischen Proteinen. Hydrophobe, hydrophile und elektrostatische molekulare Interaktionen in der Membran bedingen eine energetisch günstige Struktur (Singer, 1977). Die mosaikähnliche räumliche aber flexible Anordnung erlaubt schnelle Änderungen der Konfiguration und Verteilung der Makromoleküle. Die Bezeichnung "fluid" deutet auf eine große Mobilität der Lipidmoleküle, die entsprechend den externen Bedingungen Änderungen in der Konfiguration und Anordnung unterworfen sind. Mit Hilfe der Differential Scanning Calorimetry (DSC) kann das thermotrope Verhalten der Phospholipide demonstriert werden. Unterhalb der Phasenübergangstemperatur liegen die Lipide in einem fest-gelartigen Zustand vor und die Kohlenwasserstoffketten sind geordnet. Oberhalb der Phasenübergangstemperatur zeigen die Lipide höhere Beweglichkeit, weswegen dieser Zustand als flüssig-kristallin bezeichnet wird. Die Phasenübergangstemperatur ist charakteristisch für jedes Phospholipid und wird vornehmlich durch die Konfiguration der Acylketten bestimmt (Melchior und Steim, 1976, 1979; Hauser und Phillips, 1979). Durch Änderung der Bedingungen wie

pH-Wert und Temperatur sowie durch Agenzien wie z.B. Ca^{2+} kann die Phasenübergangstemperatur verändert und damit gegebenenfalls die Bereitschaft zur Fusion erhöht werden.

1.1.5 Mechanismus der Fusion

Dadurch, daß die Lipid-Doppelschicht das Skelett biologischer Membranen darstellt, wird eine gewisse Stabilität erreicht. Eine Interaktion und nachfolgende Fusion von Membranen sollte demnach durch reversible Veränderungen der thermodynamischen Membraneigenschaften wesentlich erleichtert werden.

Zellfusionen treten gelegentlich auch in vivo spontan auf, wobei über die Bedingungen, die dazu führen, wenig bekannt ist. In vitro kann die Zellfusion durch so verschiedenartige Agenzien wie Sendai-Virus, PEG und Ca^{2+} induziert werden. Neuere Untersuchungen unterstützen die Annahme, daß allen Agenzien ein gemeinsamer Mechanismus zugrunde liegt. Detaillierte Informationen über den molekularen Mechanismus der Membranfusion stammen von Untersuchungen an artifiziellen Lipidvesikeln (Papahadjopoulos, 1978). Dabei konnten wichtige Aussagen über den Einfluß von Lipiden, Proteinen und Metallionen auf die Membranfusion gemacht werden. So wurde festgestellt, daß divalente

Kationen wie Mg^{2+} und Ca^{2+} die Phasenübergangstemperatur der Lipide durch Ladungsneutralisation an der Membranoberfläche erhöhen. Dadurch werden "fluid $\rightarrow$ ordered" Übergänge bei gleichbleibender Temperatur induziert (Abb. 2b). Gemäß der Gouy-Chapman Theorie elektrischer Doppelschichten erhöht sich die Phasenübergangstemperatur mit abnehmender Ladungsdichte an Membranoberflächen (Overbeek, 1952). Im Gegensatz dazu bewirken monovalente Kationen wie Na^+ und K^+ "ordered $\rightarrow$ fluid" Übergänge durch Zunahme der Ladungsdichte. Der Einfluß divalenter und monovalenter Kationen auf die Phasenübergangstemperatur läßt sich mathematisch exakt beschreiben (Träuble und Eibl, 1974).

Für Lipidschichten mit hoher elektrostatischer Ladung sinkt die Phasenübergangstemperatur mit zunehmender Oberflächenladung, während sie bei abnehmender Oberflächenladung ansteigt. Die elektrostatische freie Energie der "fluid bilayer" ist geringer als die der "crystalline bilayer", und eine Zunahme der Oberflächenladung kann den Übergang in den "fluid state" bewirken. Spezifische Anlagerung divalenter Kationen wie Ca^{2+} an negativ geladene Lipidschichten erniedrigt die Oberflächenladung.

Am Beginn der Fusion steht die Agglutination. Diese erfolgt durch Neutralisation von Ladungen in den beteiligten Membranen. Die Agglutination führt jedoch nicht zwingend zur Fusion. Hierfür ist notwendig, daß in den agglutinierten Membranen ein Phasenübergang von "fluid→ordered" z.B. durch Ca^{2+} bewirkt wird. Es wird angenommen, daß in den Membranen kristalline Zonen entstehen, in denen keine Proteinmoleküle enthalten sind (Abb. 2b). Wenn der Zusatz von Ca^{2+} oberhalb der Phasenübergangstemperatur des entsprechenden Lipids erfolgt, kann gegebenenfalls ein Übergang der Membranlipide von einem "fluid state" in einen "crystalline state" erfolgen. Dieser Phasenübergang ermöglicht dann nach Ca^{2+} Entzug die Fusion (Abb. 2c, d). Die Anwesenheit von Ca^{2+} ist sowohl für die durch Sendai-Virus als auch für die durch PEG induzierte Fusion notwendig. Es ist anzunehmen, daß PEG bzw. Sendai-Virus die Agglutination bewirken und daß durch Ca^{2+} die eigentliche Fusion ausgelöst wird.

1.2 Protoplasten von Pflanzen

1.2.1 Zellwandaufbau

Die Zellwand der Pflanzenzelle gehört zum nicht essentiellen Bereich der Zelle. Eine enzymatische Auflösung

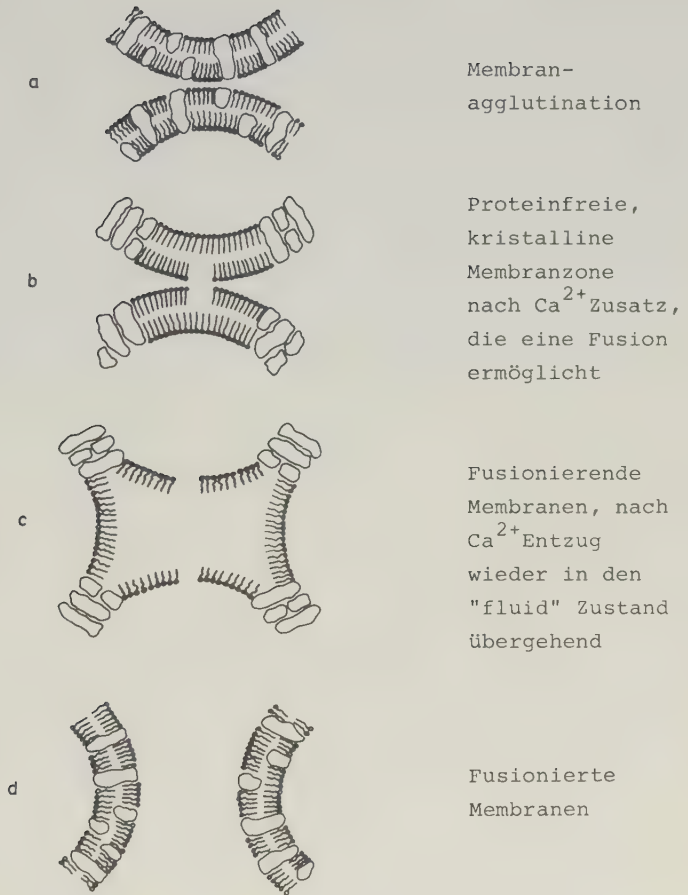


Abb. 2 Membranfusion.

der Zellwand führt dementsprechend nicht zwingend zum Tode der Zelle. Die pflanzliche Zelle grenzt mit der Mittellamelle an die sie umgebenden Zellen. Die Mittellamelle geht aus der Primordialwand hervor. Sie wird bei der Zellteilung im Bereich des Phragmoplasten unter Ablagerung der Polysaccharide Pektin und Hemizellulose, die in Golgi-Vesikeln synthetisiert werden, angelegt. Die Membranen der Golgi-Vesikel werden später in die Plasmamembran integriert. Die Mittellamelle besteht aus Poly-D-Galakturonsäure, wobei die Monosaccharide α -1,4-glykosidisch miteinander verbunden sind. Die Polygalakturonsäure-Moleküle (Pektinsäure) sind untereinander durch Ca^{2+} vernetzt, wodurch die Mittellamelle stabilisiert wird. Durch Ca^{2+} -Entzug kann der Zellverband aufgehoben werden.

Die Primärwand wird zwischen Mittellamelle und Plasmamembran angelagert. Sie besteht aus einer gallertig zähen, elektronenmikroskopisch amorphen Grundsubstanz (Matrix), die ebenfalls Poly-D-Galakturonsäure enthält. Eine elektronenmikroskopisch erkennbare Gerüstsubstanz bestehend aus Elementarfibrillen (2-4 nm Durchmesser) und Mikro-fibrillen (5-30 nm Durchmesser) ist in die Matrix eingebettet. Die Fibrillen enthalten bei höheren Pflanzen als Gerüstsubstanz hochpolymere Poly- β -D-1,4-Glukosemoleküle. Die Stellen der Glukose können je nach Pflanzenart auch

Mannan oder Xylan einnehmen.

Mittellamelle und Primärwand sind von Plasmodesmen durchzogen. Diese stellen eine kontinuierliche Fortsetzung der Plasmamembran zwischen zwei Teilen dar und dienen dem Stoffaustausch. Die Primärwand besteht zu je einem Drittel aus Zellulose, Hemizellulose und Pektin mit Protein. Die Sekundärwand wird von der Plasmalemmseite an die Primärwand angelagert und besteht zu 94 % aus Zellulose. Sie weist im Gegensatz zu der ungeordneten Streuungstextur der Primärwand eine geordnete Paralleltextur der Elementarfibrillen auf.

Ein besonders detaillierter Vorschlag für den Aufbau der pflanzlichen Zellwand stammt von Keegstra et al. (1973). Drei Gesichtspunkte erscheinen dabei besonders wichtig:

1. Die Zellwand enthält ein charakteristisches Glykoprotein mit einem relativ hohen Hydroxyprolingehalt als integralem Bestandteil.
2. Mit Ausnahme der Zellulose sind alle Makromoleküle der Zellwand kovalent miteinander verknüpft.
3. Solange es zu keiner Apposition sekundärer Zellwandschichten kommt, bleiben Mittellamelle und Zellwand nicht nur stark quellfähig, sondern auch leicht durchlässig für Wasser.

Bei Acetabularia wird die Zellulose und teilweise auch die Hemizellulose durch β -1,4-verknüpftes Mannan ersetzt,

dessen Anteil bis zu 94 % erreichen kann (Iriki, 1960). Daneben kommen Galaktose (Werz, 1964), Glukose und Protein vor. Untersuchungen über Zusammensetzung und Eigenschaften des Zellwandproteins wurden von Paradies et al., 1977, 1978) durchgeführt. Die Hut- und Stielzellwand einer Zelle weisen eine unterschiedliche Zusammensetzung auf (Zetsche, 1967). Dabei überwiegen in der Hutzellwand Glukose, Galaktose und Rhamnose, während in der Stielwand überwiegend Mannose nachweisbar ist. Rhamnose kommt nur in der Hutwand vor. Der Zellwandaufbau ähnelt dem der höheren Pflanzen (Preston, 1974).

1.2.2 Isolierung von Protoplasten

Kurze Zeit nachdem Klercker (1892) über die mechanische Isolierung von Protoplasten berichtet hatte, konnte Townsend (1897) Zellwandregeneration an isolierten Protoplasten nachweisen.

Dieses Regenerationsvermögen in Verbindung mit der Totipotenz der pflanzlichen Zelle (Haberlandt, 1902) ermöglicht die Entfaltung des morphogenetischen Potentials, führt in vielen Fällen zur Entwicklung funktionsfähiger Pflanzen aus Protoplasten und lenkt die Aufmerksamkeit auf die Isolierung von Protoplasten.

Eine enzymatische Isolierung von Protoplasten erfolgte

zuerst aus den Wurzelspitzen der Tomatenpflanze (Lycopersicum esculentum) (Cocking, 1960). Die Zellwand wurde durch Behandlung der Zellen mit Zellulase (Endo-1,4- β -glukanase, EC 3.2.1.4) aus dem Pilz Myrothecium verrucaria entfernt. In der heute angewendeten Methode wird mit Hilfe von Pektinase (Polygalakturonase, EC 3.2.1.15) aus Rhizobus spec. die Mittellamelle abgebaut, dadurch der Zellverband aufgehoben und die Zellwand mit Zellulase aus dem Pilz Trichoderma viride degradiert (Cocking, 1972). Protoplasten können auf diese Weise aus den Geweben fast aller pflanzlichen Organe isoliert werden. Aufgrund der hohen Ausbeute an Protoplasten wird jedoch bevorzugt das Mesophyllgewebe aus Blättern als Ausgangsmaterial verwendet (Power und Cocking, 1971). Eine vollständige Liste der Pflanzen, aus denen bislang Protoplasten isoliert und regeneriert werden konnten, wurde kürzlich veröffentlicht (Bajaj, 1977; Thomas et al., 1979).

Auch aus Bakterien können Protoplasten präpariert werden. Dieses kann z.B. mit Hilfe von Lysozym (EC 3.2.1.17) erfolgen (Anné und Peberdy, 1976). Bei der Lysozymbehandlung wird der Murein-Sacculus zerstört. Bei gram-negativen Bakterien ist der Murein-Sacculus mit der darunterliegenden Plasmamembran teilweise fusioniert, so daß

Wandreste nach der Lysozymbehandlung haften bleiben und deswegen zu der Bezeichnung Sphaeroplast führen. Gram-positive Bakterien werden nach Zellwandabbau als Protoplasten bezeichnet, da hier die Zellwand vollständig abgebaut wird. Biggins (1971) berichtete über die Isolierung von Protoplasten aus prokaryotischen blaugrünen Algen.

Protoplasten sind auch aus Pilzen der wichtigsten taxonomischen Gruppen isoliert worden (Peberdy et al., 1976). In ersten Versuchen wurde ein Verdauungssaft aus Helix pomata verwendet, der an Enzymaktivität hauptsächlich β -Glukuronidase/Arylsulfatase (EC 3.2.1.31/EC 3.1.6.1) enthält. Die für die Protoplastenisolierung notwendigen lytischen Enzyme werden jedoch heute aus verschiedenen Mikroben gewonnen, in denen ihre Bildung durch entsprechende Substrate induziert wurde. Wirksam sind Zellulase, Laminarase (EC 3.2.1.6), Chitinase (EC 3.2.1.14) und Glukanasen, womit die unterschiedliche Zusammensetzung der Zellwände deutlich wird (Sietsma et al., 1968).

Protoplasten von eukaryotischen Algen wurden aus Chlorella (Braun und Aach, 1975; Berliner, 1977), Micrasterias und Cosmarium (Berliner et al., 1976), Porphyridium (Clément-Metral, 1976), einigen filamentären Grünalgen (Marchant und Fowke, 1977), Acetabularia

(Primke et al., 1978), Enteromorpha (Millner et al., 1979) und Nitella (Kuroda, 1980) isoliert. Dabei wurden Zellulasen, der Verdauungssaft von Helix pomatia und Papain verwendet, woraus auf eine große Mannigfaltigkeit der Strukturelemente von Algenzellwänden oder sehr unterschiedliche Synthese-Mechanismen zu schließen ist. Die Isolierung von Protoplasten aus Algen erfolgt zum Teil ohne vollständige Zellwanddegradation. Die Zellwand wird nur an bestimmten, anscheinend präformierten Stellen abgebaut, an denen dann der Protoplastenaustritt erfolgt.

1.3 Acetabularia

1.3.1 Ontogenie, Morphologie

Die im Mittelmeer und anderen tropischen bzw. subtropischen Meeren vorkommenden siphonalen Grünalgen der Familie Dasycladaceae, insbesondere die zur Unterfamilie Acetabularioideae gehörenden Arten stellen seit den wegweisenden Versuchen von Hämmerling (1931, 1932a, b, 1935) ein interessantes Objekt für die experimentelle Zellbiologie dar.

Acetabularia ist während der vegetativen Phase ihres Lebenszyklus einkernig. Der Kern befindet sich während der vegetativen Phase in dem basal angelegten Rhizoid.

Nach vollständiger Ausbildung eines artspezifischen Gametangienstandes (Hut) teilt sich der Primärkern in Sekundärkerne. Diese gelangen nach weiteren mitotischen Teilungen in die Hutkammern und führen dort zur Zystenbildung. Bis zur Freilassung der Gameten finden weitere mitotische Kernteilungen statt. Der Zeitpunkt, an dem die Meiose stattfindet, ist bislang nicht sicher nachgewiesen.

Die Gameten entsprechen zwei mating-types. Die Fusion von zwei Gameten unterschiedlichen mating-types führt zur Zygotenbildung. Die Zygote wächst dann zur neuen Pflanze aus (Abb. 3). In klassischen Arbeiten hat Hämmerling (1932 a) gezeigt, daß Zellwachstum und speziesspezifische Morphogenese durch Kernentfernung in bestimmten Entwicklungsstadien nicht wesentlich beeinflußt werden. Die kernlose Zelle behält diese Fähigkeiten über einen längeren Zeitraum hinweg bei. Die Morphogenese führt je nach Art zur Ausbildung der folgenden makroskopischen Merkmale: (Berger et al., 1974)

1. unterschiedliche Länge (0,2 - 20 cm)
2. artspezifische Hüte mit corona superior und teilweise auch corona inferior
3. Rhizoid
4. Wirtel

Als speziesspezifische biochemische Marker fanden



Abb. 3 "Normale" Zelle von A. parvula,
Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme
x 15 (Aufnahme: Dr. S. Berger).

bisher das Isoenzymmuster der Malatdehydrogenase (Schweiger et al., 1967), der Lactatdehydrogenase (Reuter und Schweiger, 1969), sowie die ribosomalen Proteine der 80S Ribosomen (Kloppstech und Schweiger, 1973) Verwendung. Dadurch, daß Differenzierung und Fortpflanzung bei Acetabularia in einer Zelle ablaufen, bietet sich die einzigartige Möglichkeit, die damit verbundenen biologischen und biochemischen Prozesse auf zellulärer Ebene zu untersuchen (Schweiger, 1969a).

1.3.2 Kern-Cytoplasma Wechselwirkungen in Acetabularia

1.3.2.1 Kernlose Zellfragmente

Aufgrund der besonderen morphogenetischen Leistungen ist Acetabularia für das Studium der Kern-Cytoplasma-Wechselwirkungen besonders geeignet, z.B. im Hinblick auf die Frage, wie genetische Information im Cytoplasma in spezifische Morphogenese umgesetzt wird (Schweiger, 1979). Das gleiche gilt auch für den Einfluß des Cytoplasmas auf den Zellkern sowie die Kooperation der Kern-, Mitochondrien- und Chloroplastengenome. Es wird erwartet, daß diese Untersuchungen letztlich zu einer Aussage über die zeitliche Organisation und Regulation der Genexpression, d.h. die zeitliche und kausale Abfolge der einzelnen Differenzierungsschritte führen. Aufgrund der langen Lebensdauer lassen sich besonders

gut die biologischen Leistungen kernloser Zellen von Acetabularia studieren.

Da der Primärkern von Acetabularia während der gesamten vegetativen Phase im Rhizoid lokalisiert ist, kann die Herstellung kernloser Zellen durch einfache Amputation des Rhizoides erreicht werden. Hämmerling konnte schon 1932 an der Art A. mediterranea das Regenerations- und Differenzierungsvermögen kernloser Zellfragmente anhand der artspezifischen Ausbildung des Gametangienstandes zeigen (Hämmerling, 1932a, 1934c). Aus dieser Tatsache läßt sich der Schluß ziehen, daß die Differenzierungsprozesse nicht auf dem Niveau der Transkription reguliert werden. Dies folgt außerdem aus der Tatsache, daß die Zelle nach der Kernentfernung fortfährt, alternierend Stiel und Wirtel zu bilden und erst bei Erreichen eines spezifischen Differenzierungsstadiums der Hut angelegt wird.

1.3.2.2 Transplantationsexperimente

Die Rolle des Zellkernes bei der artspezifischen Morphogenese und beim Auftreten verschiedener biochemischer Marker ließ sich bei Acetabularia besonders gut in Transplantationsexperimenten zeigen. Durch Transplantation kernhaltiger Rhizoide auf kernlose, insbesondere basale Zellfragmente, konnte eine für den

Zellkern spezifische Hut- und Zystenbildung induziert werden (Hämmerling, 1931, 1932a, 1935, 1943). Die kernabhängige artspezifische Formbildung wurde zuerst an homologen Transplantaten gezeigt. Eine Erweiterung dieser Versuche stellten heterologe Transplantationen dar. Wechselseitige Transplantationen zwischen A. mediterranea und A. wettsteinii wurden ausgeführt, indem entweder ein kernloses Stielstück von A. wettsteinii auf ein kernhaltiges Rhizoid von A. mediterranea oder umgekehrt transplantiert wurde (Hämmerling, 1935). Die beiderseitigen Teilstücke stammten dabei von weit entwickelten, aber noch hutlosen Zellen. Die kernlosen Komponenten hatten demnach den größten Teil ihrer Entwicklung unter dem Einfluß des arteigenen Kernes durchgemacht. Durch Einwirkung des artfremden Kernes konnte eine jeweils kernspezifische Hutbildung induziert werden.

1.3.2.3 Implantationsexperimente

Neben der Möglichkeit, Zellhybride durch Transplantation von kernhaltigen Rhizoiden herzustellen, kann man auch zunächst Zellkerne isolieren und dann diese in ein Akzeptorcytoplasma implantieren. Damit können cytoplasmatische Einflüsse ausgeschlossen werden. Der Primärkern kann auf einfache Weise aus amputierten

Rhizoiden isoliert werden (Hämmerling, 1955, 1963; Richter, 1959). Homologe und heterologe Implantationen führten ebenfalls zur Ausbildung kernspezifischer Gametangienstände und zur Zystenbildung. Aus den Implantaten konnte man die Tochtergeneration gewinnen. Diese wies kerndeterminierte morphologische und biochemische Marker auf (Schweiger et al., 1969b). So entstand unter dem Einfluß des implantierten Kernes ein der Spezies entsprechendes Isoenzymmuster der Malatdehydrogenase (Schweiger, 1967). Dieses gilt auch für andere kernkodierte Chloroplastenproteine (Apel und Schweiger, 1972; Kloppstech und Schweiger, 1972). Auch der circadiane Rhythmus der Sauerstoffproduktion unterliegt der Kontrolle des Kernes, dem damit innerhalb der Zelle eine zentrale regulatorische Rolle zukommt (Schweiger et al., 1964). Als Ergebnis seiner Experimente postulierte Hämmerling (1934b, 1943, 1963) die Existenz morphogenetischer Substanzen. Diese kontrollieren die kernspezifische Hut- und Zystenbildung sowie die Ausprägung der spezifischen, kernabhängigen biochemischen Marker. Auch wenn der Beweis bislang nicht geführt worden ist, spricht vieles dafür, daß die artspezifischen, morphogenetischen Substanzen den Character von mRNA haben (Brachet, 1968; Kloppstech und Schweiger, 1975, 1976; Shoeman, 1978).

2. Methoden und Material

2.1 Kultur der Algen

Alle verwendeten Algen gehören zur Unterfamilie Acetabularioideae.

Die Algen wurden unter standardisierten Bedingungen bei 20° C kultiviert. Als Lichtquelle dienten Leuchtstoffröhren der Firma Philipps (Modell TL 65/29). Die Beleuchtungsstärke betrug 2500 Lux mit einer Beleuchtungsperiode von 08:00 bis 20:00. Alle Kulturen wurden in voll definiertem, synthetischen Müller-Medium (Müller, 1962) gehalten. Die Zusammensetzung des Mediums ist in Tab. 1 wiedergegeben. Das Medium wurde aus Stammlösungen hergestellt und anschließend mittels Filtration durch Sartorius-Vorfilter Typ SM 13400 und Sartorius-Membranfilter Typ SM 11107, Porengröße 0.2 µm, sterilisiert (Sartorius, Göttingen).

2.2 Gewinnung von "haploiden" Acetabularia-Zellen

Zysten von Acetabularia (Polyphysa) cliftonii wurden in Mikrotiterplatten (Greiner, Nürtingen) vereinzelt und unter standardisierten Kulturbedingungen gehalten (Green, 1976).

Die aus einer Zyste schwärmenden Gameten kopulierten nicht, sondern entwickelten sich innerhalb von 2-3

Tab. 1 Zusammensetzung des Müller-Mediums.

NaCl	475.0	mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	26.6	mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	23.0	mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	13.5	mM
KCl	9.8	mM
NaHCO ₃	2.4	mM
NaNO ₃	1.18	mM
H ₃ BO ₃	32.0	µM
NaBr	185.0	µM
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	140.0	µM
SrCl ₂ x 6 H ₂ O	14.0	µM
Na ₂ SiO ₃ x 9 H ₂ O	70.0	µM
EDTA-Na ₂ x 2 H ₂ O	53.7	µM
LiCl	0.14	µM
ZnCl ₂	14.0	µM
MnSO ₄ x H ₂ O	3.8	µM
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0.83	µM
AlCl ₃ x 6 H ₂ O	0.21	µM
Fe-III-citrat	1.2	µM
RbCl	0.13	µM
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0.04	µM
KJ	0.12	µM
CuSO ₄	0.008	µM
Thiamin-HCL	100.0	µg/l
Biotin	0.5	µg/l
Vitamin B 12	0.5	µg/l

Monaten zu sphärisch geformten Zellen (Abb. 4). Um deren Wachstum zu fördern, wurden sie zu diesem Zeitpunkt in Petrischalen (5 cm Ø) überführt. Nach weiteren 4 Wochen hatten sie einen Durchmesser von 0.4 - 0.5 mm erreicht und konnten dann zur Protoplastenisolierung eingesetzt werden.

2.3 Protoplastenisolierung

2.3.1 Zellwandabbau *in vitro*

2.3.1.1 Zellwandisolierung von "normalen" Zellen

Fünzig Zellen von A. cliftonii wurden gebündelt und durch Amputation der Rhizoide kernlos gemacht. Die kernlosen Zellen wurden an Deckeln über Zentrifugenröhrchen befestigt und der Zellinhalt bei 2400 x g 10 min auszentrifugiert (Schweiger, 1966). Die "leeren" Zellwände wurden in flüssigem Stickstoff gründlich gemörsert. Die pulverisierten Zellwände wurden in 10 ml 0.1 M Phosphatpuffer suspendiert. Die Herstellung des Phosphatpuffers erfolgte durch Zusammengeben von 40.5 ml 0.2 M Na_2HPO_4 und 9.5 ml 0.2 M NaH_2PO_4 , pH 7.4, und auffüllen auf 100 ml. Anschließend wurde 1 mg Proteinase K/ml zugegeben. Die Suspension wurde bei 3000 x g 10 min abzentrifugiert. Das Sediment wurde dreimal in Phosphatpuffer, einmal in Äthanol, einmal in Äthanol/Diäthyläther (1:1) ge-

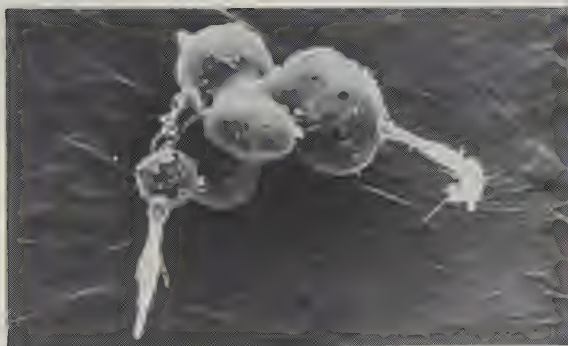


Abb. 4 "Haploide" Zellen von A. cliftonii
Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen,
a. x 40, b. x 10 (Aufnahmen Dr. S. Berger).

waschen und abzentrifugiert. Zum Schluß wurde das Sediment noch einmal in Diäthyläther gewaschen, abzentrifugiert (3000 x g, 10 min) und schließlich getrocknet. Das so erhaltene Präparat wurde als Substrat in den Enzymtests eingesetzt.

2.3.1.2 Reinigung und Aktivitätsbestimmung von
 β -Mannosidase aus Luzernensamen
 (Medicago sativa)

Die Isolierung erfolgte nach der Methode von Villarroja (1976). Petrischalen (9 cm Ø, mit zwei Lagen Whatman-Papier Nr. 1 ausgelegt) wurden mit 2 g Luzernensamen und mit 6 ml Leitungswasser beschickt. Die Samen wurden bei 23° C und 12 h Licht - 12 h Dunkel für 41 - 48 h zum Keimen gebracht. Alle folgenden Arbeiten erfolgten im Kühlraum.

Die Keimlinge wurden in 10 ml einer 0.9 % NaCl-Lösung gemörsert und nach Zugabe von weiteren 10 ml NaCl-Lösung 3 h bei 4° C auf dem Magnetrührer gerührt. Die Suspension wurde 30 min bei 12100 x g zentrifugiert, das Sediment verworfen und der Überstand 24 h gegen Citrat-Phosphatpuffer dialysiert. Zur Herstellung des Citrat-Phosphatpuffers wurden 71.5 ml 0.1 M Citronensäure mit 0.2 M Na_2HPO_4 auf pH 3.5 eingestellt und auf 100 ml aufgefüllt. Das während der Dialyse ent-

standene Präzipitat wurde bei 12100 x g für 10 min abzentrifugiert und verworfen. Der Überstand wurde auf eine Konzentration von 80 % Ammoniumsulfat gebracht und das Präzipitat anschließend bei 34800 x g 20 min abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 10 ml destilliertem Wasser aufgenommen und 24 h gegen destilliertes Wasser dialysiert. Das während der Dialyse entstandene Präzipitat wurde bei 12100 x g 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde als Enzymlösung (β -Mannosidase) bei den Inkubationen eingesetzt. Um Enzymaktivität nachzuweisen, wurden Galaktomannane aus Ceratonia siliqua L. (Seiler, 1977) in Gegenwart des Extraktes inkubiert. Freigesetzte Mannosereste und andere Zucker wurden nach der Methode von Frank und Kirberger (1950) bestimmt.

2.3.1.3 Abbau von isoliertem Zellwandmaterial mit Glykosidasen

Als Substrat diente das aus A. cliftonii isolierte Zellwandmaterial. Jeweils 5 mg wurden in Gegenwart der nachfolgend aufgeführten Enzyme (Boehringer, Mannheim) in getrennten Ansätzen inkubiert:

		Konzentration im Ansatz
1. α -Amylase	EC 3.2.1.1	5 mg/ml
2. β -Amylase	EC 3.2.1.2	500 μ l/ml
3. α -Glukosidase	EC 3.2.1.20	1 ml/ml
4. β -Glukosidase	EC 3.2.1.21	1 ml/ml
5. β -Galaktosidase	EC 3.2.1.22	200 μ l/ml
6. α -Mannosidase	EC 3.2.1.24	1 ml/ml
7. β -Mannosidase	EC 3.2.1.25	1 ml/ml
8. β -Fruktosidase	EC 3.2.1.26	5 mg/ml
9. β -Glukuronidase	EC 3.2.1.31	100 μ l/ml
10. β -Glukuronidase/ Arylsulfatase	EC 3.2.1.31/ 3.1.6.1	500 μ l/ml
11. α -L-Fukosidase	EC 3.2.1.51	250 μ l/ml

Außerdem wurde versucht, isoliertes Zellwandmaterial durch Kombination der Glykosidasen mit Hemizellulase (10 mg/ml; überlassen von Prof. G. Richter, Hannover, und Zellulase (50 mg/ml; Kinki Yakult, Nishinomiya, Japan) abzubauen. Um die kombinierte Wirkung der Glykosidasen zu testen, wurden 5 mg Zellwandmaterial mit folgenden Enzymkombinationen in bestimmter Reihenfolge und in den angegebenen Konzentrationen in 200 μ l 0.2 M Natriumacetatpuffer, pH 5.5, inkubiert. Den Ansätzen wurde jeweils nach 1 h Inkubation ein weiteres Enzym hinzugefügt. Die Inkubationen erfolgten im Schüttelwasserbad bei 30° C. Folgende Enzymkombinationen wurden angewendet:

1. β -Mannosidase/ β -Fruktosidase/ α -Amylase/ β -Amylase/
 β -Glukuronidase-Arylsulfatase/ α -L-Fukosidase
2. β -Glukuronidase/ β -Mannosidase/ β -Glukosidase
3. β -Galaktosidase/ α -Mannosidase
4. β -Galaktosidase/ β -Mannosidase
5. α -Glukosidase/ β -Mannosidase
6. Hemizellulase/ β -Mannosidase
7. Zellulase/ β -Mannosidase
8. β -Glukosidase/Hemizellulase/ β -Mannosidase
9. β -Glukosidase/ β -Galaktosidase/ β -Mannosidase
10. β -Glukosidase/Hemizellulase/ β -Mannosidase
11. β -Mannosidase/ β -Glukosidase/Hemizellulase
12. Hemizellulase/ β -Mannosidase/ β -Glukosidase

Freigesetzte Mannosereste und andere Zucker wurden nach der Methode von Frank und Kirberger (1950) bestimmt.

2.3.2 Zellwandabbau in vitro

2.3.2.1 Abbau mit Glykosidasen

2.3.2.1.1 Pektinase und Zellulase

2.3.2.1.1.1 Methode nach Keller und Melchers (1973)

Lösungen:

A. 0.7 M Mannitol

B. 0.7 M Mannitol, 0.5 % Macerozyme R 10 (Pektinase, Kinki Yakult, Nishinomiya, Japan), 0.5 % Dextran-sulfat, pH 5.7

- C. 0.7 M Mannitol, 0.5 % Pektinase (Sigma, München),
0.5 % Dextransulfat, pH 5.7
- D. 0.7 M Mannitol, 2 % Zellulase "Onozuka" R 10
(Kinki Yakult), 0.1 % Dextransulfat, pH 5.5
- E. 0.7 M Mannitol, 2 % Zellulase (Sigma, München),
0.1 % Dextransulfat, pH 5.5

Inkubation:

Fünfzig "haploide" Zellen von A. cliftonii wurden 15 min bei 25° C in 10 ml Lösung A im Schüttelwasserbad inkubiert. Danach wurden die Zellen in 10 ml Lösung B bzw. C überführt und weitere 30 min inkubiert. Eine Inkubation in 10 ml Lösung D bzw. E erfolgte anschließend für 3 h bei 25°. Als Nachweis der Protoplastenisolierung diente die mikroskopische Kontrolle.

2.3.2.1.1.2 Methode nach Power und Cocking (1969)

Lösungen:

0.5 % Macerozyme R 10 (Pektinase, Kinki Yakult, Nishinomiya, Japan), 5 % Zellulase "Onozuka" R 10 (Kinki Yakult), 20 % Saccharose, pH 5.6

Inkubation:

Fünfzig "haploide" Zellen von A. cliftonii wurden für 4 h bei 25° in 10 ml Enzymlösung im Schüttelwasserbad inkubiert. Als Nachweis der Protoplastenisolierung diente die mikroskopische Kontrolle.

2.3.2.1.2 β -Mannosidase aus Luzernensamen

Fünfzig "haploide" Zellen von A. cliftonii wurden in 0.5 ml Müller-Medium, 0.5 ml 0.2 M Natriumacetatpuffer, pH 5.0, und 0.4 ml β -Mannosidase (Luzernensamenextrakt) für 1 h bei 37° im Schüttelwasserbad inkubiert. Als Nachweis der Protoplastenisolierung diente die mikroskopische Kontrolle.

2.3.2.1.3 β -Mannosidase und β -Glukosidase

Fünfzig "haploide" Zellen von A. cliftonii wurden in 0.5 ml Müller-Medium, 0.5 ml 0.2 M Natriumacetatpuffer, pH 5.0, und 0.4 ml β -Mannosidase aus Luzernensamen für 60 min bei 37° im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach Beendigung der ersten Inkubation wurden 10 mg β -Glukosidase (in fester Form) (Sigma, München) zugegeben und für weitere 60 min unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Als Nachweis der Protoplastenisolierung diente die mikroskopische Kontrolle.

2.3.2.1.4 β -Glukuronidase/Arylsulfatase

Fünfzig "haploide" Zellen von A. cliftonii wurden in 0.5 ml Müller-Medium, 0.5 ml 0.2 M Natriumacetatpuffer, pH 5.0 und 100 μ l β -Glukuronidase/Arylsulfatase (Lösung in Wasser) (Boehringer, Mannheim) für 60 min

bei 37° im Schüttelwasserbad inkubiert. Als Nachweis der Protoplastenisolierung diente die mikroskopische Kontrolle.

2.3.2.2 Isolierung von Protoplasten mit Hilfe von Papain aus "haploiden" Zellen

Zwanzig bis dreißig Zellen von A. cliftonii wurden auf einem Objektträger, 5 x 7 cm, mit einer Vertiefung, in 0.2 ml einer Lösung von 0.9 % NaCl, 2 mM EDTA-Na₂, pH 7.5, bei Raumtemperatur für mindestens 1 h inkubiert. Die Papainkonzentration betrug 5 mg/ml. Papain wurde nach der Methode von Smyth (1967) vorbehandelt. Eine entsprechende Menge einer wasserunlöslichen Papainpräparation (Sigma, München) wurde in 5 Teilen 0.9 % NaCl suspendiert und abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 0.9 % NaCl-Lösung, 2 mM EDTA-Na₂, pH 7.5, aufgenommen. Die Protoplasten konnten unmittelbar nach der Isolierung zur Fusionierung eingesetzt werden.

2.4 Präparation von Cytoplasten aus "normalen" Zellen

Zur Präparation von Cytoplasten wurden Zellen von A. cliftonii in 1:1 verdünntem Müller-Medium mit einer Wecker-Schere in Fragmente zerschnitten. Der Zellinhalt wurde mit einer Präpariernadel ausgedrückt (Abb. 5). Es war auch möglich, die Fragmente längere

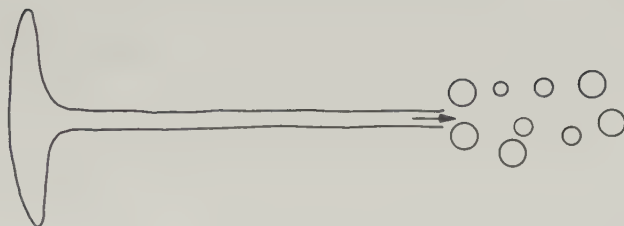


Abb. 5 Präparation von Cytoplasten.

Zeit unberührt stehen zu lassen. Das dabei austretende Cytoplasma rundete sich in dem als isotonisch angesehenen Medium, bestehend aus 9 Teilen Seewasser und 1 Teil destilliertem Wasser zu Cytoplasten ab (Gibor, 1965). Diese Cytoplasten wurden zur Fusion eingesetzt.

2.5 Fusionierung von Protoplasten, Cytoplasten und Karyoplasten

Experimente zur Fusionierung von Protoplasten aus "haploiden" A. cliftonii Zellen wurden in 1:1 verdünntem Müller-Medium durchgeführt. Es wurden keine die Fusion induzierenden Agenzien verwendet. Die fusionierten Protoplasten wurden in 1:1 verdünntem Müller-Medium bei 20° unter 12 h Licht - 12 h Dunkel gehalten.

Die Fusion von Cytoplasten aus "normalen" Zellen von A. cliftonii und anderen Arten erfolgte auf die gleiche Weise, ebenso die Fusion von Cytoplasten und Protoplasten. In ähnlicher Weise und unter vergleichbaren Bedingungen wurde mit Kernen experimentiert, die unter Bedingungen isoliert wurden, bei denen die den Zellkern umgebende Plasmamembran erhalten blieb, und die als Karyoplasten bezeichnet werden.

2.6 Aktivitätsuntersuchungen an "haploiden"
 Zellen und Cytoplasten von A. cliftonii

2.6.1 Inkorporation von ^{35}S -Methionin in Cytoplasten
 von "normalen" A. cliftonii

Fünfundzwanzig Cytoplasten aus A. cliftonii Zellen wurden in 20 μl Inkubationsmedium in Eppendorf-Röhrchen für 2 h bei 25° inkubiert. Das Inkubationsmedium bestand aus 1:1 verdünntem modifizierten Müller-Medium, in dem 100 mM NaCl durch 100 mM Tris, pH 7.2, ersetzt war, um die Pufferkapazität zu erhöhen. Diesem Medium wurde pro Ansatz 1 μCi ^{35}S -Methionin mit einer spezifischen Aktivität von 890 Ci/mmol (Amersham Buchler, Braunschweig) zugesetzt. Nach Beendigung der Inkubation wurde das Inkubationsmedium vorsichtig abgenommen, womit verhindert wurde, daß die Cytoplasten zerfielen. Diese wurden dann in 10 μl 0.8 M Tris-Puffer, der mit gesättigter Borsäure auf pH 8.64 eingestellt war und

1.5 mg Rinderserumalbumin/ml (Cohn-Fraktion V; Serva, Heidelberg) enthielt, homogenisiert. Zum Homogenat wurde 1 ml 6 % Trichloressigsäure zugegeben und die Probe für 5 h bei 4° belassen. Das dabei entstehende Präzipitat wurde an Nitrocellulosefilter (Sartorius-Membranfilter Typ SM 11306, 0.45 µm Porengröße; Sartorius, Göttingen) gebunden und dreimal mit 5 % Trichloressigsäure gewaschen. Die Filter wurden 12 h bei Raumtemperatur getrocknet. Die Radioaktivität der Probe wurde in einem Packard Tri Carb Scintillation Spectrometer, Model 3330, bestimmt. Der Szintillationscocktail enthielt pro 1 l Toluol 2 g Permablend bestehend aus 91 % PPO und 9 % bis-MSB (Packard, Frankfurt).

2.6.2 Inkorporation von $^{14}\text{CO}_2$ in Cytoplasten und "haploide" Zellen von A. cliftonii

Zehn Cytoplasten bzw. "haploide" Zellen wurden in 20 µl 1:1 verdünntem modifizierten Müller-Medium bei 25° inkubiert. Zum Ansatz wurde 1 µCi $^{14}\text{CO}_2$ als $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (spezifische Aktivität 59.9 mCi/mmol; Amersham Buchler, Braunschweig) zugegeben. Die Inkubation wurde nach der entsprechenden Zeit durch Zugabe von 20 µl Eisessig gestoppt. Der durchmischte Ansatz wurde auf Filterplättchen aufgetragen, über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und die Radioaktivität der Probe

wie unter 2.6.1 bestimmt. Nach der Homogenisation wurden 5 µl des Ansatzes vor der Eisessigzugabe zur Chlorophyllbestimmung eingesetzt (Arnon, 1949).

2.7 Versuche zur Fusionierung von isolierten Kernen in vitro

2.7.1 Isolierung von Kernen aus "haploiden" Zellen von A. cliftonii

Um Kerne ohne anhaftendes Cytoplasma zu erhalten, wurden diese in Kernpuffer isoliert, der 0.067 M Phosphatpuffer nach Sörensen, pH 7.4, 0.3 M Saccharose, 5 mM Magnesiumacetat und 0.1 % Rinderserumalbumin enthielt (Berger et al., 1975).

Die Isolierung erfolgte unter einem Stereomikroskop mit 30 - 50facher Vergrößerung. Die Zelle wurde mit einer Pasteurpipette auf einen silikonisierten Objektträger in einen Tropfen Puffer überführt, mit einem Skalpell vorsichtig angeschnitten und das Cytoplasma mit einer Präpariernadel vorsichtig ausgedrückt. Der in dem Cytoplasma befindliche Kern war aufgrund der lichtbrechenden Nukleoli relativ gut zu erkennen. Er wurde mit einer fein ausgezogenen Pipette anschließend zweimal in Puffer gewaschen und konnte dann zur Fusionierung eingesetzt werden.

2.7.2 Versuche zur Fusionierung von isolierten Kernen

Zwei Kerne wurden unmittelbar vor dem Versuch aus zwei "haploiden" A. cliftonii Zellen in Kernpuffer isoliert. Die Kerne wurden dreimal in 0.1 M TES-Puffer pH 8.0, der 10 % Saccharose enthielt, gewaschen. Um die äußere Lipidmembran und die prinukleären Cytoplasmaschichten (siehe auch Abb. 12, 13) abzulösen, erfolgte eine Behandlung mit Triton X-100 in folgender Lösung: 2 ml TES-Puffer, 100 µl Monooleinlösung, 10 µl Triton X-100. Um den Einfluß von Ca^{2+} zu untersuchen, wurde die Ca^{2+} -Konzentration des TES-Puffers in den einzelnen Versuchen zwischen 10 - 70 mM variiert (TOTC-Lösung). Die Monoolein-Stammlösung wurde folgendermaßen hergestellt. 100 mg Monoolein (Sigma, München) wurden in 10 ml Hexan gelöst und bei 4° aufbewahrt. 100 µl wurden zu jedem Versuch über Nacht gefriergetrocknet (Christ Gefriertrocknungsanlage Gamma I) und in 2 ml des TES-Puffers für 1 min mit Ultraschall behandelt. Die Kerne wurden 1 - 2 min in der TOTC-Lösung belassen. Dann wurde die Lösung ab- und eine PEG-Lösung hinzupipettiert. Diese Lösung enthielt 0.1 M TES, pH 8.0, 10 % PEG 4000 (Roth, Karlsruhe) und in den einzelnen Versuchen von 10 - 70 mM CaCl_2 (TP-Lösung). Die Kerne wurden 1 min in der TP-Lösung belassen. Diese Lösung

wurde dann ab- und eine Lösung, die 1 ml TES-Puffer und 200 µl foetales Kälberserum (Seromed, München) enthielt, zupipettiert. Die Kerne wurden anschließend in apikale Fragmente von A. mediterranea Zellen implantiert oder für die elektronenmikroskopische Untersuchung eingesetzt.

2.8 Methoden zur Überprüfung des Erfolges der Kernfusion

2.8.1 Implantation von Fusionsprodukten in kernlose Fragmente von Acetabularia Zellen

Implantationen wurden in Kernpuffer unter einem Stereomikroskop bei 30 - 50facher Vergrößerung durchgeführt. Von "normalen" Zellen von A. cliftonii wurde der basale Teil ca. 1 cm oberhalb des Rhizoides abgeschnitten und verworfen. Um das basale Ende des kernlosen Fragmentes wurde in Nähe der Schnittstelle eine Schleife aus chirurgischem Nähgarn gelegt. Die fusionierten Kerne wurden mit einer fein ausgezogenen Pipette aufgenommen und durch die Schnittöffnung in das Fragment implantiert. Das Fragment wurde danach mit der Schleife zugebunden. Die Zellen wurden 24 h unter Dauerlicht belassen und anschließend unter standardisierten Kulturbedingungen gehalten.

2.8.2 Elektronenmikroskopische Kontrolle

Die "fusionierten" Kerne wurden für 2 h in einer Lösung von 2 % Glutaraldehyd in Kernpuffer ohne Rinderserumalbumin fixiert. Anschließend wurden die Kerne sechsmal in Kernpuffer gewaschen und 1 h in einer Lösung von 2 % Osmiumtetroxid in Kernpuffer ohne Rinder-serumalbumin nachfixiert. Nach wiederholtem Auswaschen in Kernpuffer und destilliertem Wasser wurden die Kerne in eine 0.5 % Agarlösung überführt. Der Agarblock wurde nach Erstarren auf ca. 1 mm Kantenlänge geschnitten und 30-45 min in Dimethoxypropan (DMP), dem zu 10 ml 10 µl 0.1 N HCl zugesetzt war, entwässert (Muller et al., 1975). Der Agarblock wurde dann 2 h in einer Epon : DMP Mischung 1:3, 12 h in einer Epon : DMP Mischung 1:1 und 2 h in einer Epon : DMP Mischung 3:1 belassen und anschließend in eine mit Epon gefüllte Beam-Kapsel überführt. Das Epon wurde 24 h bei 36°, 24 h bei 48° und 24 h bei 65° gehärtet. Die Schnitte wurden mit 5 % Uranylacetat und 5 % Bleicitrat kontrastiert und im Siemens Elmiskop I angesehen.

2.9 Mikroinjektion in Karyoplasten von Acetabularia

2.9.1 Mikroinjektion von RNA und DNA

Karyoplasten wurden in 1:1 verdünntem Müller-Medium aus "normalen" A. crenulata isoliert (Abb. 6).

Mittels einer feinen Glaskapillare ($\emptyset$ 50 μm) wurde der Kern angesaugt und in Position gehalten. Die Mikroinjektion erfolgte mittels einer feinen Glaskapillare, die einen äußeren Durchmesser von 10 μm hatte und an einen Mikromanipulator (Leitz, Wetzlar) angeschlossen war. Folgende Nukleinsäuren wurden injiziert:

1. 100 μl TMV RNA-Lösung in einer Konzentration von 2.3 mg/ml in 0.1 M Glycin-Puffer, pH 8.5, der 2.5 % NaCl enthielt.
2. 100 μl Mengovirus RNA-Lösung in einer Konzentration von 6 mg/ml in 10 mM Tris-Puffer, pH 7.5.
3. 150 μl Adenovirus Typ 2 DNA-Lösung in einer Konzentration von 220 μg DNA/ml in 0.01 M Tris-Puffer, pH 7.3, der 0.001 M EDTA- Na_2 enthielt.

Die Mikroinjektionen wurden von Cairns (1978a, b, c) durchgeführt. Zur Injektion wurden jeweils Karyoplasten mit einem Durchmesser von 150-200 μm eingesetzt und als Kontrolle diente die Injektion der entsprechenden Menge Puffer.

2.9.2 Nachweis von Translationsprodukten der injizierten Nukleinsäuren

Ein Nachweis der durch die Injektion von Mengovirus RNA, TMV RNA oder Adenovirus Typ 2 DNA induzierten

Synthese spezifischer Proteine erfolgte mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz. Um die beladenen Karyoplasten mit Acetabularia Cytoplasma zu kombinieren, wurden sie mit A. ryukyuensis Cytoplasten fusioniert. Die Fusionierung von Karyoplasten mit Cytoplasten erfolgte in 1:1 verdünntem Müller-Medium. In bestimmten Zeitabständen wurden die so gewonnenen beladenen Fusionsprodukte nach folgendem Schema weiter analysiert:

1. Die Karyoplasten wurden für 30 min in 4 % Formaldehyd-Lösung + 0.12 mM Digitonin fixiert.
2. Die Karyoplasten wurden in isotonischem 0.1 M Tris-Puffer, pH 7.4, der 2.5 % NaCl enthielt, viermal gewaschen und dabei jeweils 1 h in der Waschlösung belassen.
3. Die Bildung von Antikörpern gegen spezifische Mengovirus RNA, TMV RNA und Adenovirus Typ 2 DNA Proteine wurde in Kaninchen induziert. Die Karyoplasten wurden in Gegenwart des Serums (Stammlösung) 1:50 verdünnt), in Tris-Puffer für 30 min inkubiert.
4. Die Karyoplasten wurden danach zweimal in isotonischem Tris-Puffer gewaschen.
5. Die Karyoplasten wurden dann 30 min mit Fluorescein-isothiocyanat konjugiertem IgG behandelt (aus Schweineserum, 1 % Lösung, 1:75 verdünnt; Institute of Sera and Vaccines, Prag, Tschechoslowakei).

6. Abschließend wurden die Karyoplasten viermal in isotonischem Tris-Puffer und viermal in dem jeweiligen Injektionspuffer gewaschen.
7. Nach Einbettung der Karyoplasten in Polyviol (Wacker Chemie, München) wurden diese auf Immunfluoreszenz im Zeiss Axiomaten geprüft.

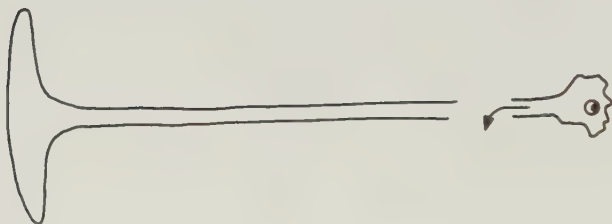


Abb. 6 Isolierung von Karyoplasten

3. Ergebnisse

3.1 Kultur der Algen

Die Aufzucht von Acetabularia erfolgte zunächst in Erd-Schreiber-Medium (Schweiger, 1969a). Das Medium enthielt in 1500 ml Seewasser als Zusätze 40 ml eines 20 % Erdextraktes sowie 40 ml Na_2HPO_4 Lösung mit 0.8 mg/ml und 40 ml NaNO_3 Lösung mit 4 mg/ml und ist sowohl wegen des Seewasseranteils als auch wegen des Erdextraktes von relativ undefinierter Zusammensetzung.

In Versuchen mit verschiedenen synthetischen Medien erwies sich das zuerst von Provasoli beschriebene und später von Müller modifizierte Medium für die Aufzucht von Acetabularia auch im Zusammenhang mit den hier durchgeführten Experimenten sehr geeignet (Müller, 1962; Schweiger et al., 1977).

In Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß die Gameten verschiedener Arten von Acetabularia aus vereinzelter Zysten am besten in Müller-Medium schwärmen und wachsen. Es bestanden jedoch je nach der verwendeten Art wesentliche Unterschiede in der Ausbeute an den "haploiden" Zellen. A. cliftonii wurde aufgrund der größten Ausbeute und des besten Wachstums für die Versuche eingesetzt. Um das gesamte System unter einheitlichen Bedingungen zu halten, wurden alle Algen, die für Versuche benötigt wurden, in Müller-Medium aufgezogen.

3.2 Protoplastenisolierung

3.2.1 Anwendung von Glykosidasen in vitro und in vivo

Aufgrund von Untersuchungen von Frei und Preston (1968) war bekannt, daß die Zellwände einiger Algenarten, einschließlich Acetabularia, hauptsächlich aus β -1,4-verknüpften Mannoseresten bestehen. Es wurde daher zuerst versucht, die Zellwand mit β -1,4-Mannosidase (EC 3.2.1.25) aus Luzernensamen (Villarroya et al., 1976) abzubauen.

Tab. 2 Abbau von Zellwandmaterial aus A. cliftonii
mit β -Mannosidase. Die Inkubation erfolgte bei
37° für 1 h in 0.2 M Natriumacetatpuffer, pH 5.0.

Substrat	Menge (mg)	β -Mannosidase (μ l)	Puffer (μ l)	Zuckeräquivalente (mg %)
Zellwand	10	500	200	38.70
"	10	500	200	34.70
"	10	-	700	8.80
Galakto- mannan (Roth)	5	500	200	476.15
"	5	500	200	511.75
"	5	-	700	10.09
Galakto- mannan (Sigma)	5	500	200	383.00
"	5	500	200	414.00
"	5	-	700	10.09

Tab. 3 Abbau isolierten Zellwandmaterials von Acetabularia in vitro mit verschiedenen Kombinationen glykosidischer Enzyme.

Enzyme	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	x	-	-	-	+	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ = fast vollständiger Abbau isolierten Zellwandmaterials

x = vollständiger Abbau des Galaktomannans aus Ceratoniasiliqua L.

- = kein nennenswerter Abbau isolierten Zellwandmaterials

- | | | |
|--|----------------------------|---------------------------|
| 1) α -Amylase | 2) β -Amylase | 3) α -Glukosidase |
| 4) β -Glukosidase | 5) α -Galaktosidase | 6) α -Mannosidase |
| 7) β -Mannosidase | 8) β -Fruktosidase | 9) β -Glukuronidase |
| 10) β -Glukuronidase/Arylsulfatase | 11) β -Xylosidase | |
| 12) α -L-Fukosidase | 13) Hemizellulase | 14) Zellulase. |

Wie aus Tab. 2 ersichtlich, wurden die Galaktomannane aus Ceratonia siliqua vollständig abgebaut, während isoliertes Zellwandmaterial von Acetabularia von dem Enzym nicht angegriffen wurde. In weiteren Versuchen wurden verschiedene glykosidische Enzyme, auch in Kombination mit Hemizellulase und Zellulase, getestet, deren Substrate möglicherweise in Zellwänden von Acetabularia vorkommen. Wie aus Tab. 3 ersichtlich, erwiesen sich alle Kombinationen hinsichtlich einer Zellwanddegradation als inaktiv. Lediglich die Kombination β -Mannosidase/Glukuronidase/Arylsulfatase führte zu vollständigem Abbau des Zellwandmaterials (Tab. 3 und 4). Die Glukuronidase/Arylsulfatase Kombination stellt vermutlich ein relativ heterogenes Enzymgemisch aus Helix pomatia dar, so daß die gleichzeitige Einwirkung mehrerer, jedoch undefinierter, Enzyme eine Degradation des Zellwandmaterials in vitro bewirkt. Der vollständige Zellwandabbau ließ sich an den "haploiden" Zellen nicht wiederholen. Es konnte auch kein teilweiser Abbau beobachtet werden. Ebenso waren alle glykosidischen Enzyme in vivo wirkungslos. Auch die Anwendung von Zellulase und Pektinase auf "haploide" Zellen erwies sich als ungeeignet. Wahrscheinlich werden durch die Zellwandisolierung und -zerkleinerung Angriffspunkte für die Enzyme freigelegt, die in der intakten Zellwand

Tab. 4 Abbau von Zellwandmaterial aus A. cliftonii mit β -Glukuronidase/Arylsulfatase und β -Mannosidase. Die Inkubation erfolgte bei 37° für 1 h in Gegenwart von β -Mannosidase oder β -Glukuronidase/Arylsulfatase bzw. zunächst für 1 h in Gegenwart von β -Mannosidase und dann für 1 h in Gegenwart von β -Mannosidase und β -Glukuronidase/Arylsulfatase jeweils in 0.2 M Natriumacetatpuffer, pH 5.0. Das Substrat war in jedem Falle 10 mg Zellwand.

Puffer (μ l)	β -Mannosidase (μ l)	β -Glukuronidase/ Arylsulfatase (μ l)	Zuckeräqui- valente (mg %)
200	200	-	46.70
200	200	-	44.50
400	-	100	127.00
400	-	100	128.33
200	200	100	1357.25
200	200	100	1513.00

maskiert sind. Hinzu kommt, daß die Calcifizierung der Acetabularia-Zellwand eine enzymatische Einwirkung erschwert oder unter Umständen ganz verhindert. Die mikroskopische Kontrolle der in vivo Inkubation zeigte in keinem Fall "leere" Zellen bzw. das Auftreten von Protoplasten. Dagegen kann die Zystenwand, die hauptsächlich aus Zellulose besteht (Herth et al., 1975), mit Zellulase teilweise degradiert werden. Es findet jedoch kein vollständiger Abbau statt, sondern eher ein "Aufweichen" der Wand, so daß auf Druck der Inhalt an einer exponierten Stelle austritt. Diese Beobachtung könnte sich als nützlich für die Isolierung von Gameten in unterschiedlichen Entwicklungsstadien erweisen.

3.2.2 Anwendung von Papain

Untersuchungen an Polysaccharid-Mikrokristallen haben gezeigt (Parker et al., 1969), daß die Feinstruktur von Acetabularia-Zellwänden nach Papainbehandlung erhalten bleibt. Jedoch war ein Abbau von Zellwandproteinen festzustellen. Untersuchungen über Zusammensetzung und Eigenschaften des Zellwandproteins in Acetabularia wurden von Paradies et al. (1977, 1978) durchgeführt.

In unseren Experimenten, die auf die Gewinnung von Protoplasten aus "haploiden" Zellen von A. cliftonii abzielten, wurden die Zellen mit Papain, das nach der Methode von Smyth (1967) aufbereitet war, inkubiert. Innerhalb von 30 - 60 min traten aus den meisten Zellen Protoplasten aus (Abb. 7). Die Ausbeute betrug meistens ca. 30-40 % und wurde durch längere Inkubation nicht wesentlich erhöht. Dabei war die Protoplastenausbeute bei jungen Zellen größer. Dies war wahrscheinlich auf die weniger starre Zellwand junger Zellen zurückzuführen. Unter der Papainbehandlung blieb die Zellwand, soweit im Lichtmikroskop erkennbar, im wesentlichen erhalten. Lediglich an einer Stelle entstand ein Kanal, durch den der Protoplastenaustritt erfolgte.

Die einzelnen Stadien waren hierbei unter dem Stereomikroskop gut zu verfolgen. Zuerst erschien die Plasmamembran, gefüllt mit wenigen Chloroplasten. Dann strömten weitere Chloroplasten nach, so daß sich der Protoplast ausdehnte. Der Vorgang erfolgte kontinuierlich, bis der gesamte Protoplast ausgetreten war. Wenn die Zellen während der Inkubation nicht bewegt wurden, konnte der gesamte Protoplast austreten, ohne daß in einem Zwischenstadium Fragmente abgetrennt wurden. Unter diesen Bedingungen wurden



Abb. 7 Gewinnung von Protoplasten aus "haploiden" Zellen von A. cliftonii; verschiedene Stadien, Interferenzkontrast x 40.

fast ausschließlich Protoplasten erhalten, d.h. der Zellinhalt einschließlich Zellkern. Die Protoplasten erreichten auch fast den Durchmesser der Zelle von ca. 0.5 mm und Kontrollen haben gezeigt, daß die größeren Zellfragmente immer kernhaltig waren. Der Protoplastenaustritt war innerhalb von 5 - 20 min beendet.

Die isolierten Protoplasten waren in dem Inkubationsmedium stabil und konnten mit einer Pipette in 1:1 verdünntes Müller-Medium überführt werden und unmittelbar zur Fusion eingesetzt werden. In unverdünntem Müller-Medium platzten die Protoplasten.

3.3 Fusionierung von Cytoplasten, Protoplasten und Karyoplasten

Die Fusion von Zellfragmenten von Acetabularia (Cytoplasten, Protoplasten und Karyoplasten) erfolgte in 1:1 verdünntem Müller-Medium spontan, wenn mindestens zwei Fragmente in engen Kontakt miteinander gebracht wurden. Dabei waren fusionsinduzierende Agenzien, wie PEG oder Sendai-Viren nicht notwendig. Die Fragmente waren nach 5-10 min vollständig fusioniert und rundeten sich dann ab. Die einzelnen Fusionsstadien waren unter dem Lichtmikroskop gut zu verfolgen (Abb. 8). Die Kerne fusionierten jedoch nicht. Nach der Fusion

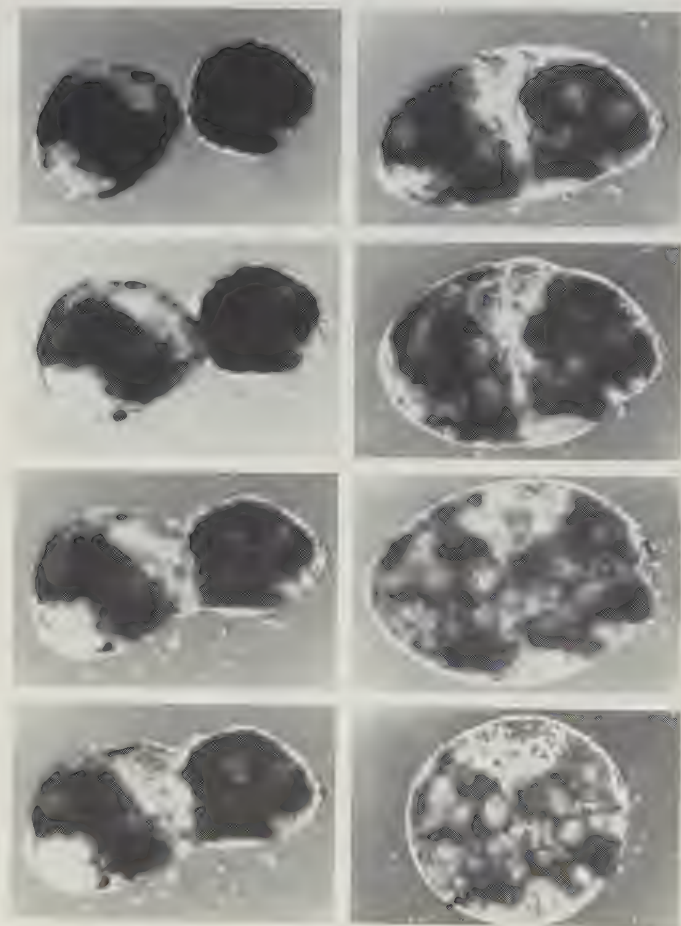


Abb. 8 Verschiedene Stadien der Fusion zweier Protoplasten aus "haploiden" Zellen von A. cliftonii, Interferenzkontrast x 40.

konnten die Zellkerne der beiden beteiligten Protoplasten gut dargestellt werden (Abb. 9).

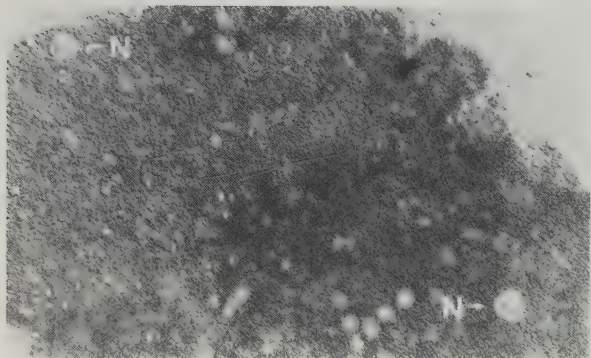


Abb. 9 Zwei fusionierte Protoplasten aus "haploiden" Zellen von A. cliftonii mit zwei Kernen (N), Interferenzkontrast x 160.

Protoplasten aus Zellen von einer Zyste zeigten jeweils die gleiche Fusionsbereitschaft wie Protoplasten aus zwei verschiedenen Zysten. Daraus konnte geschlossen werden, daß auf diesem Niveau zwischen Protoplasten gleichen mating-types, wie das bei Protoplasten aus einer Zyste zwangsläufig der Fall ist,

keine Inkompatibilität besteht. Des weiteren war es möglich, mehrere "haploide" Protoplasten zu fusionieren. Es konnten bis zu 20 Protoplasten zu einer Einheit kombiniert werden, die einen Durchmesser bis zu 1 mm erreichen konnte. Die Fusionierung "haploider" Protoplasten mit Cytoplasten aus "normalen" Zellen der Arten A. mediterranea, A. crenulata, A. ryukyuensis und A. cliftonii war unter den gleichen Bedingungen möglich und erfolgte auf die gleiche Art. Es konnten auch hier keine Unterschiede in der Fusionsbereitschaft erkannt werden.

Cytoplasten der genannten Arten ließen sich ebenfalls ohne Schwierigkeiten miteinander fusionieren. In Abb. 10 ist die Fusionierung von 9 Cytoplasten aus A. cliftonii dargestellt. Auch hierbei ließen sich 15 und mehr Cytoplasten zu einer Einheit kombinieren. Weiterhin war eine Fusionierung von Cytoplasten mit Karyoplasten und von Karyoplasten untereinander möglich. Karyoplasten wurden erhalten, indem Kerne aus "normalen" Zellen vorsichtig in isotonischem 1:1 verdünnten Müller-Medium isoliert wurden, wobei eine Cytoplasmaschicht und eine intakte Plasmamembran um den Kern erhalten blieb. Karyoplasten aus A. mediterranea, A. ryukyuensis, A. crenulata und A. cliftonii konnten untereinander und mit Cytoplasten und Protoplasten aller genannten Arten fusioniert werden. Auch hierbei

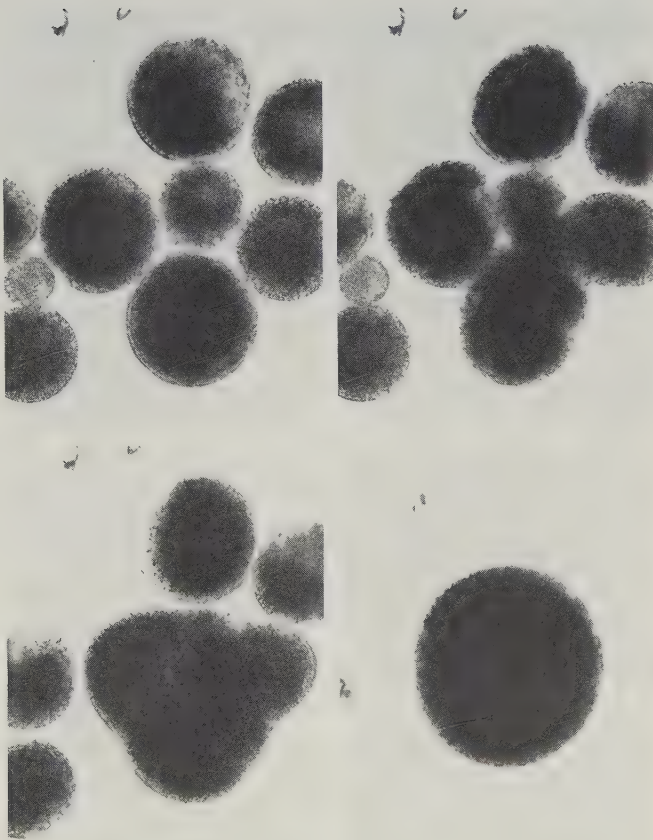


Abb. 10 Fusionierung mehrerer Cytoplasten aus "normalen" Zellen von A. cliftonii, Interferenzkontrast x 40.

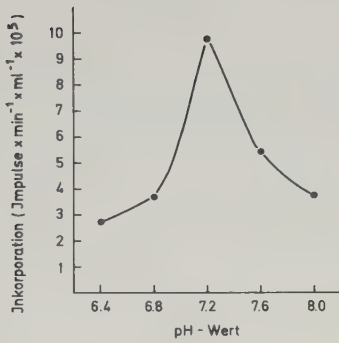
konnten keine Unterschiede in der Fusionsbereitschaft beobachtet werden.

Da die Fusion in Müller-Medium spontan erfolgte, konnte angenommen werden, daß unter Umständen die darin enthaltenen Ionen ausreichten, um eine Ladungsneutralisation der Membranoberfläche zu bewirken. Damit wurde die Agglutination der Fragmente erreicht. Ob hierbei dem in dem Medium enthaltenen Ca^{2+} (13.5 mM als CaCl_2) eine ähnliche Rolle zugesprochen werden kann wie bei der Fusion tierischer Zellen und Protoplasten von höheren Pflanzen, konnte nicht entschieden werden. Die Membran befand sich vermutlich auch in einem relativ instabilen Zustand, wodurch die Fusionsbereitschaft der Zellfragmente gefördert wurde. Die Protoplasten, Cytoplasten und Karyoplasten waren sehr fragil und mußten vorsichtig gehandhabt werden, um nicht zu zerplatzen. Eine Zentrifugation war nicht möglich.

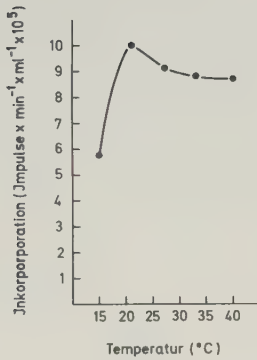
3.4 Aktivitätsuntersuchungen an Cytoplasten und "haploiden" Zellen von *A. cliftonii*

3.4.1 Metabolische Aktivität

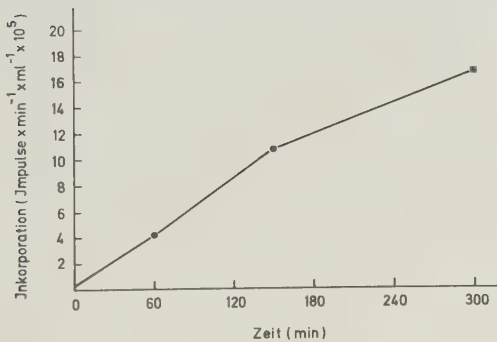
Die Inkorporationsrate für ^{35}S -Methionin zeigte in Cytoplasten aus *A. cliftonii* eine starke Abhängigkeit vom pH-Wert des Inkubationsmediums (Abb. 11a). Modifiziertes Müller-Medium war im Gegensatz zu Puffer-



a



b



c

Abb. 11 ³⁵S-Methionininkorporation in Cytoplasten aus "normalen" Zellen von A. cliftonii. a. Abhängigkeit vom pH-Wert
b. Abhängigkeit von der Temperatur
c. Abhängigkeit von der Zeit.

systemen besser zur Inkubation geeignet. Um die Pufferkapazität des Mediums zu erhöhen und den osmotischen Wert des Mediums beizubehalten, wurden 100 mM NaCl durch 100 mM Tris ersetzt. Das Medium wurde anschließend auf pH 7.2 eingestellt. Das Medium wurde auch zur Isolierung von Cytoplasten eingesetzt, um die durch den Vakuolensaft verursachten pH-Wert Schwankungen zu puffern. Die Abhängigkeit der Inkorporationsrate von der Temperatur (Abb. 11b) war weniger ausgeprägt. Es ist nicht klar, ob dieses für alle Arten gilt. Die metabolische Aktivität der Cytoplasten zeigte sich auch in dem in Abb. 11c und Tab. 5 dargestellten kontinuierlichen Anstieg der Proteinsynthese, die im Verlauf von 5 h fast linear verläuft. Dies deutet auf einen intakten Proteinsyntheseapparat hin und zeigt, daß mit der Isolierung dieser Fragmente aus dem Zellverband keine wesentlichen Aktivitätseinbußen verbunden sind.

3.4.2 Photosynthetische Aktivität

Sowohl intakte "haploide" Zellen als auch isolierte Cytoplasten waren in der Lage, $^{14}\text{CO}_2$ in eine säurestabile Fraktion einzubauen (Tab. 6). Dabei lagen die Inkorporationsraten in beiden Fällen in ähnlichen Größenordnungen, wobei die "haploiden" Zellen etwas

Tab. 5 Inkorporation von ^{35}S -Methionin (spezifische Aktivität 770 Ci/mmol) in Cytoplasten aus "normalen" Zellen von A. cliftonii in Abhängigkeit von der Zeit.

Probe	Inkubationszeit (min)	Inkorporation (Impulse $\times$ min $^{-1}$ $\times$ ml $^{-1}$ $\times$ 10 5)
1	0	2.32
2	0	3.01
3	0	2.95
Mittelwert		2.76
1	60	5.288
2	60	3.257
3	60	3.756
Mittelwert		4.100
1	150	8.883
2	150	13.068
3	150	10.377
Mittelwert		10.666
1	300	16.597
2	300	17.911
3	300	15.438
Mittelwert		16.649

mehr einbauten. Nach 1 h betrug die Inkorporation in Cytoplasten 73 % der Inkorporationsrate der "haploiden" Zellen. Nach 2 h betrug sie nur noch 52 %. Möglicherweise bewirkte ein Ungleichgewicht zwischen der Produktion von C_4 -Säuren und deren Decarboxylierung durch RuBP carboxylase-oxygenase (RuBP:Ribulose 1,5-bisphosphat) ein Absinken des pH-Wertes in den Cytoplasten, der in den intakten Pflanzen besser gepuffert werden konnte. Dadurch könnte eine enzymatisch etwas ungünstige Stoffwechsellage entstanden sein. Insgesamt war die Herabsetzung der metabolischen und photosynthetischen Aktivität in den Cytoplasten keinesfalls so groß, daß sie eine verminderte Regenerationsfähigkeit der Zellfragmente erklären könnten. Auch die ausbleibende Zellwandregeneration könnte einer mangelnden metabolischen und photosynthetischen Aktivität nicht zugeschrieben werden.

Möglicherweise ist die Ursache hierfür eher in einer dem Entwicklungsstand entsprechenden Unfähigkeit zu suchen, morphogenetische Information zu exprimieren. Die verwendeten "haploiden" Zellen waren aus hoch differenzierten Geschlechtszellen hervorgegangen. Ebenso wie es nicht möglich ist, aus hoch differenzierten Mensch-Maus Hybridzellen einen Mensch-Maus-Hybriden zu züchten, scheint dies mit Pflanzenzellen, die sich in einem bestimmten Differenzierungsstadium

Tab. 6 Inkorporation von $^{14}\text{CO}_2$ (spezifische Aktivität 59.9 mCi/mmol) in Cytoplasten aus "normalen" Zellen von A. cliftonii und in "haploide" A. cliftonii Zellen.

System	Inkubations- bedingungen	Zeit (h)	Chlorophyll- gehalt des Ansatzes in mg x ml ⁻¹	Inkorporation Impulse x min ⁻¹ x 10 ⁵ x ml ⁻¹ pro mg Chlorophyll	
	Dunkel	-	-	-	-
Cyto- plasten	Licht	0	2.33	0.646	0.009
	Licht	1	2.33	15.089	0.226
	Licht	2	2.33	19.387	0.291
	Dunkel	2	2.05	1.401	0.023
"Haploide" Zellen	Licht	0	2.05	0.733	0.012
	Licht	1	2.05	20.643	0.352
	Licht	2	2.05	37.234	0.635

befinden bzw. ein bestimmtes Differenzierungsstadium überschritten haben, auch nicht mehr möglich zu sein. Möglicherweise sind die Zellen in diesem Stadium nicht mehr totipotent und so nicht mehr fähig, eine normale Pflanze zu bilden. Um diese Totipotenz wieder herzustellen, müßte demnach erst eine Kernverschmelzung eintreten.

3.5 Versuche zur Fusionierung von isolierten Kernen aus "normalen" und "haploiden" Acetabularia

3.5.1 Methodische Versuche

Aufgrund ihrer Größe (ca. 100 μm $\emptyset$) sind Zellkerne von Acetabularia relativ einfach zu handhaben. Deshalb war es im Rahmen der Fusionsexperimente interessant, durch Anwendung der Verfügbaren Fusionstechniken den Versuch zu unternehmen, isolierte Kerne in vitro zu fusionieren. Für genetische Untersuchungen wäre eine Fusion von isolierten Kernen, verbunden mit der Möglichkeit, haploide Genome zu kombinieren, von besonderer Bedeutung. In Anlehnung an Untersuchungen von Ahkong et al. (1973), die Erythrozyten durch Zusatz von Monoolein fusionieren konnten, wurden die ersten Fusionsexperimente mit Monoolein durchgeführt. Die kombinierte Anwendung von Monoolein und Triton X-100, das zur Ablösung der perinukleären Membranen (Abb. 12 und 13) zugesetzt werden mußte, führte zu einer geringen

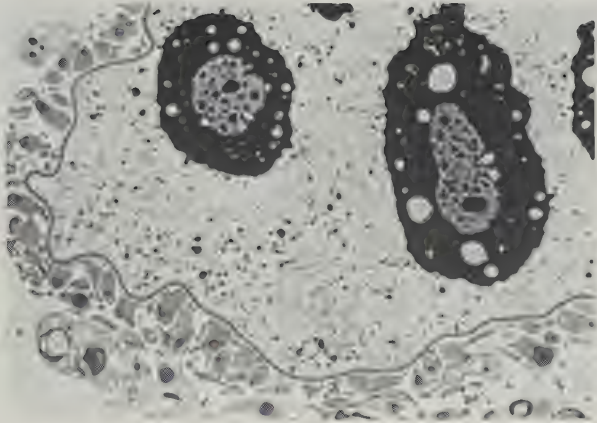


Abb. 12 Unbehandelter Kern aus einer "normalen" Zelle von *A. cliftonii*. Elektronenmikroskopische Aufnahme, Teilansicht x 2700.
Abb. 13 Perinukleäre Membran und perinukleäres Cytoplasma (rechte Bildseite). Elektronenmikroskopische Aufnahme x 41250.
(Aufnahmen: Dr. S. Berger)

Agglutination der Kerne, die jedoch nicht reversibel war. Bei diesen Versuchen zeigte sich, daß der Monoolein - Triton X-100 Lösung Ca^{2+} zugesetzt werden mußte, wenn eine Auflösung der Nukleoli vermieden werden sollte. Zusatz unterschiedlicher Ca^{2+} -Mengen (Endkonzentration: 10-70 mM CaCl_2) führte dabei zu einer stärkeren Agglutination, d.h. die Kerne agglutinierten über einen weiteren Membranbereich. Bei den hohen Ca^{2+} -Konzentrationen wurden die Membranen in starkem Maße in Mitleidenschaft gezogen, die Kerne wurden sehr fragil. In weiteren Experimenten wurde versucht, durch Zusatz von PEG eine Kernfusion zu erreichen. Es wurde PEG verschiedenen Molekulargewichts verwendet (MG 1500, 4000, 6000) wobei sich PEG 4000 in einer Konzentration von 10 % am geeignetsten erwies. Bei dieser Konzentration wurde die lichtmikroskopisch erkennbare Kernstruktur am wenigsten verändert. Darüber hinaus wies diese Konzentration die besten Agglutinationseigenschaften auf. Nach der Monoolein-Triton X-100 Behandlung wurden die Kerne nur jeweils 1 min in der PEG-Lösung belassen, um die schädigende Wirkung des PEG soweit wie möglich herabzusetzen. Versuche mit längerer Inkubationszeit in Gegenwart von PEG zeigten keine besseren Resultate. Während der PEG-Behandlung schrumpften die Kerne etwas und agglutinierten sofort nach PEG-Zusatz. Diese Agglutination war irreversibel

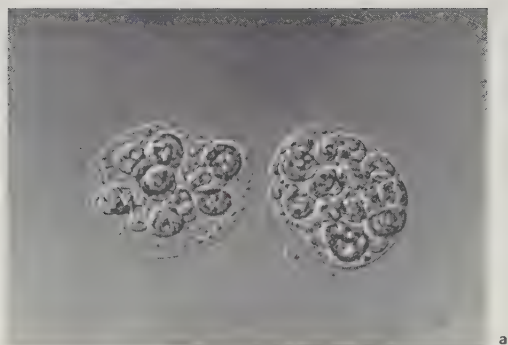
und erstreckte sich über einen weiten Membranbereich (Abb. 14, 15 und 16). Durch Zusatz von Ca^{2+} in verschiedenen Konzentrationen (Endkonzentration: 10-70 mM) veränderten sich die Kerne mit steigender Ca^{2+} -Konzentration sehr stark. Zu hohe Ca^{2+} -Konzentrationen und ein pH-Wert von 10.5 führten zur fast vollständigen Membranauflösung, während bei einem pH-Wert von 7.4 die Membran intakt blieb (Abb. 15). Bei höheren Ca^{2+} Konzentrationen (70 mM) veränderte sich auch die Kernstruktur erheblich (Abb. 15d - f). Bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen (10 mM) waren diese Veränderungen nicht so gravierend (Abb. 15 a - c). Auch eine Inkubation der Kerne in Gegenwart von Ca^{2+} über Nacht führte zu keiner Fusion der agglutinierten Membranen (Abb. 15c), obwohl z.T. kaum ein Zwischenraum zwischen den Membranen mehr bestand (Abb. 16).

3.5.2 Nachweis der Kernfusion

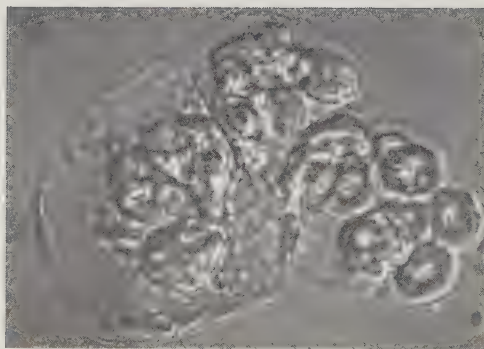
3.5.2.1 Aktivitätskontrolle in vivo

Um die Lebensfähigkeit der "fusionierten" Kerne festzustellen, wurden diese in apikale Zellfragmente oder kernlose Basalfragmente implantiert.

In Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß einzelne "haploide" Kerne nach Implantation in kernlose Basalfragmente von "normalen" Zellen keine Morphogenese induzierten. Von kernlosen Basalfragmenten ist seit



a



b

Abb. 14 Agglutination von Kernen
aus "normalen" Zellen von A. cliftonii,
a. zwei isolierte Kerne, Interferenz-
kontrast x 300, b. agglutinierte
Kerne, Interferenzkontrast x 800
(pH 7.4, 10% PEG 4000, 10 mM Ca^{2+}).

langem bekannt, daß sie morphogenetisch inaktiv sind (Hämmerling, 1934c). In weiteren Experimenten wurde gefunden, daß weder zwei einzelne Kerne von "haploiden" Zellen noch zwei fusionierte Karyoplasten in einem kernlosen Basalfragment Formbildung induzierten. Durch diese Vorversuche war sichergestellt, daß Wachstum und Morphogenese von kernlosen Basalfragmenten nach Implantation von "fusionierten" Kernen auf die Fusion der Kerne zurückzuführen wären. Eine Implantation von "fusionierten" Kernen in kernlose Basalfragmente induzierte jedoch weder Längenwachstum noch Hutbildung. Des weiteren wurden "fusionierte" Kerne in kernlose apikale Zellfragmente implantiert. Dadurch sollte festgestellt werden, ob implantierte, "fusionierte" Kerne eine Zystenbildung induzieren können. Im positiven Falle würde dies bedeutet haben, daß sich die Kerne zumindest mitotisch geteilt hätten. Es konnte jedoch in keinem Implantationspräparat eine Zystenbildung festgestellt werden. Ob die fehlende Zystenbildung auf die Fusionsmethode, durch die die Kerne möglicherweise inaktiviert wurden, zurückzuführen ist oder eine Unfähigkeit der beiden "haploiden" Genome darstellt, als aktives dihaploides Genom in einem gemeinsamen Karyoplasma zu koexistieren, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden.

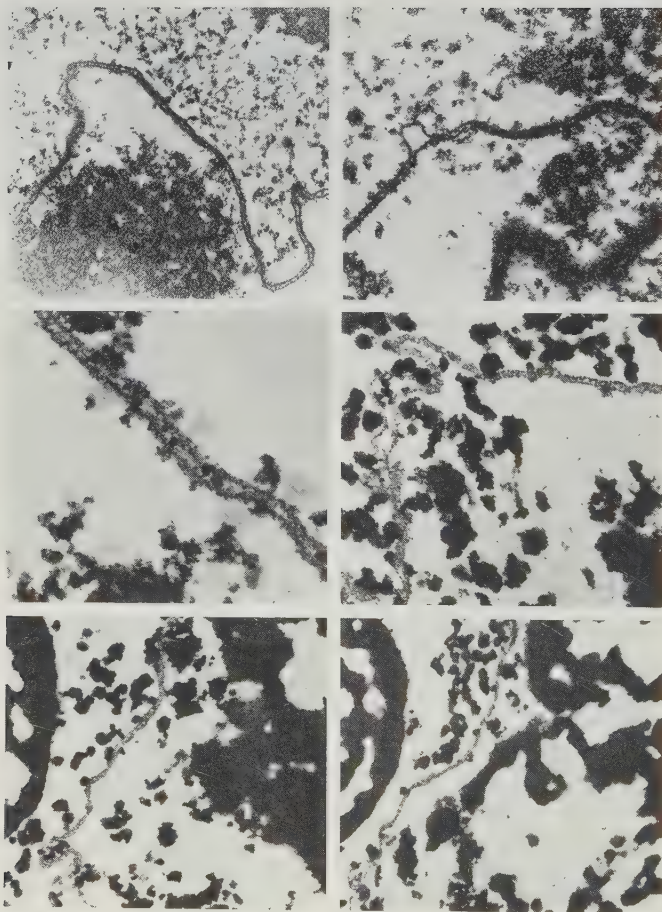


Abb. 15 Agglutination von Kernen aus "haploiden" Zellen von A. cliftonii. Elektronenmikroskopische Aufnahmen, Teilansicht a. x 6000, b. x 10000, c. x 15000, d. x 12750, e. x 9000, f. x 7500.
a-c. pH 7.4, 10 % PEG 4000, 10 mM Ca^{2+}
d-e. pH 7.4, 10 % PEG 4000, 70 mM Ca^{2+} .

3.5.2.2 Elektronenmikroskopische Kontrolle

Um festzustellen, inwieweit die Fusionsbehandlung zu einer tatsächlichen Membranfusion und damit zur Ausbildung von Karyoplasmabrücken führte, wurden die behandelten Kerne elektronenmikroskopisch untersucht. Sowohl in lichtmikroskopischen (Abb. 14) als auch in elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 15 und 16) ist eine starke Agglutination der Kerne festzustellen. Diese Agglutination findet über einen weiten Bereich der Membran statt (Abb. 16). Während noch überwiegend ein geringer Zwischenraum zwischen den Membranen erkennbar ist, scheinen die Membranen an einigen Stellen stärker agglutiniert zu sein (Abb. 15a, b). In keinem Falle ist jedoch mit absoluter Sicherheit eine Auflösung der Membran erreicht worden. Möglicherweise wurde durch Ca^{2+} und PEG zwar eine Neutralisation der Ladung der Membranoberflächen und damit eine Agglutination der Membranen bewirkt, während der zur Fusion notwendige Phasenübergang der Lipidmoleküle nicht stattgefunden hat. Dies würde unter anderem die Annahme bestätigen, daß eine Agglutination der Membranen zwar eine Voraussetzung ist, zur Fusion alleine aber nicht ausreicht.

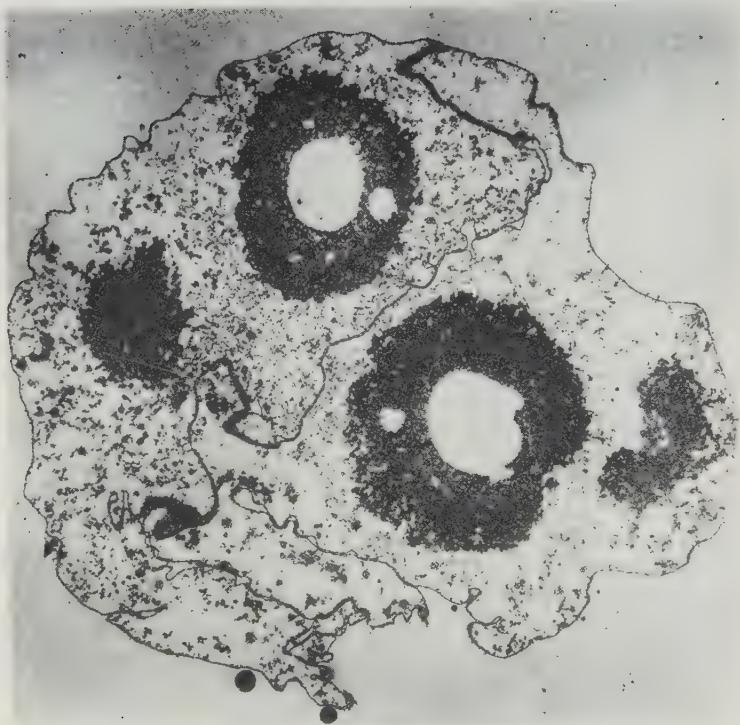


Abb. 16 Agglutination von Kernen aus "haploiden" Zellen von A. cliftonii. Elektronenmikroskopische Aufnahme, Gesamtansicht x 2400 (pH 7.4, 10 % PEG 4000, 10 mM Ca^{2+}).

3.6 Mikroinjektion von Nukleinsäuren in isolierte Karyoplasten von Acetabularia

Die Kombination der beiden zellbiologischen Techniken der Fusionierung und der Mikroinjektion eröffnet eine interessante Möglichkeit, die Regulation der Genexpression zu untersuchen. Diese Möglichkeit besteht darin, daß artfremdes genetisches Material zunächst durch Mikroinjektion in einen isolierten Zellkern von Acetabularia eingebracht wird. Dieser beladene Kern bzw. Karyoplast wird dann mit Cytoplasma aus Acetabularia kombiniert, wobei die Fusionierung des beladenen Karyoplasten mit Cytoplasten einen besonders schonenden Weg darstellt (Abb. 17). Der Nachweis, daß das auf diese Weise in die Zelle eingebrachte artfremde genetische Material tatsächlich exprimiert wird, erfolgt mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz (Cairns et al., 1978a, b, c).

Der oben skizzierte Weg wurde zunächst mit Mengovirus-RNA beschrieben. Mengoviren gehören zur Gruppe der Picornaviren. Diese tierischen Viren bestehen, soweit wir wissen, nur aus RNA und Protein, wobei die RNA einsträngig vorliegt. Es wird angenommen, daß das Virus aus 32 Capsomeren zusammengesetzt ist, die mindestens drei Antigendeterminanten tragen. Die RNA kann anhand standardisierter Techniken isoliert werden.

In unseren Experimenten wurden die durch Mikroinjektion von Mengovirus RNA beladenen Karyoplasten mit Cytoplasten fusioniert (Abb. 17). Die Karyoplasten bzw. Cytoplasten hatten dabei einen Durchmesser von jeweils ca. 200 μm . Die Fusionierung erfolgte in 1:1 verdünntem Müller-Medium ohne Zusätze. In den vorliegenden Experimenten wurden Karyoplasten aus A. crenulata mit Cytoplasten aus A. ryukyuensis fusioniert. Die Isolierung von Karyoplasten bzw. Cytoplasten erfolgte aus "normalen" Zellen, die eine Länge von 40-50 μm hatten. Die Isolierung und Beladung der Karyoplasten mit Mengovirus RNA sowie die Fusionierung nahmen ca. 30-45 min in Anspruch. Anschließend wurde Cytoplasma, das nach verschiedenen Zeiten aus den Fusionsprodukten gewonnen wurde, mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz untersucht. Dabei wurde bereits einen Tag nach der Operation eine ausgeprägte Fluoreszenz beobachtet, die in den darauffolgenden Tagen abnahm, aber bis zum 5. Tag nach der Injektion erhalten war (Tab. 7A). Die Fluoreszenz ließ sich eindeutig nachweisen (Abb. 18) (Cairns et al. 1978b), wie ein Vergleich einer Aufnahme, die unter normalen Lichtmikroskopiebedingungen gewonnen wurde (Abb. 18a), mit einer Aufnahme, die mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie erhalten wurde (Abb. 18b), zeigte. In einem Kontrollexperiment, bei dem Tris-Puffer statt Mengovirus RNA injiziert wurde, konnte keine Fluoreszenz beobachtet werden (Abb. 18c, d und Tab. 7E). Dies gilt auch für Karyoplasten, die unmittelbar

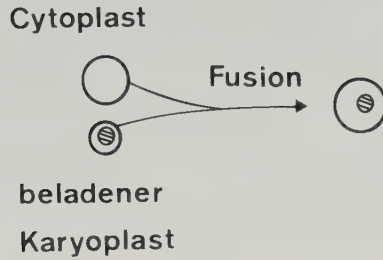


Abb. 17 Fusion eines beladenen Karyoplasten mit einem Cytoplasten.

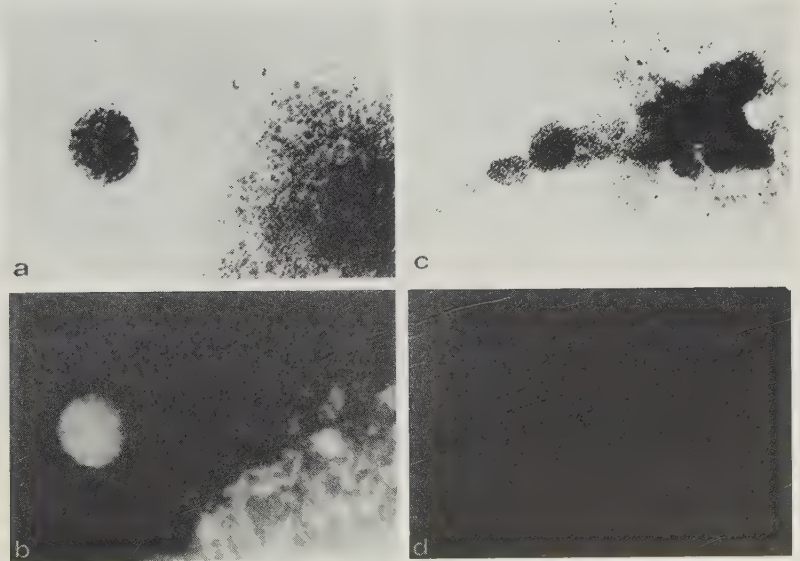


Abb. 18 Nachweis der Immunfluoreszenz an Cytoplastenpräparationen 48 h nach der Injektion, x 500.

Erläuterungen siehe Text.

nach der Injektion von Nukleinsäuren der Analyse unterworfen wurden (Tab. 7D). Diese Kontrolle schließt die Möglichkeit aus, daß das injizierte Präparat Eigenfluoreszenz besitzt. Ferner wurde gezeigt, daß sowohl die Antikörper als auch die Fluorescein-markierten Antikörper die Zell- und Kernmembran durchdringen können (Tab. 7B, C). In einem Experiment (Tab. 7B) wurden Mengovirus-Partikel in isolierte Kerne injiziert und das Cytoplasma unmittelbar nach der Injektion sowie 48 h danach untersucht. Dabei zeigte sich im Cytoplasma unmittelbar nach der Injektion keine Fluoreszenz, während sie nach 48 h sowohl in diesem Cytoplasma als auch in isolierten, beladenen Kernen nachweisbar war (Tab. 7C). Dagegen wiesen Kerne, in die Mengovirus RNA injiziert war, unmittelbar nach der Injektion keine Fluoreszenz auf (Tab. 7D).

Die hier beschriebenen Experimente belegen in eindeutiger Weise, daß tierisches genetisches Material in Cytoplasma von Acetabularia translatiert werden kann. Der Protein-syntheseapparat scheint prinzipiell zwischen Tier- und Pflanzenreich austauschbar zu sein.

In anderen Experimenten konnte die Translation von TMV RNA als auch die Transcription und Translation von Adenovirus Typ 2 DNA in Acetabularia Cytoplasma nachgewiesen werden (Cairns et al., 1978a, c).

Das Acetabularia System ist damit für Untersuchungen der Regulation der Genexpression prinzipiell mit dem Oocyten

Tab.7 Nachweis von Translationsprodukten von mikroinjizierter Mengovirus RNA (MV RNA) in Acetabularia Cytoplasma anhand der indirekten Immunfluoreszenz.

Experiment	Tage nach der Injektion	injiziertes Material	Anzahl der Versuche					Negative Kontrollen
			1	2	3	4	5	
A	0	MV RNA	0	0	0	0	0	5
	1	MV RNA	+	+	+	0	+	5
	2	MV RNA	+	+	+	+	+	5
	5	MV RNA	+	+	0	+	0	5
	12	MV RNA	0	0	0	0	0	5
B	0	MV Partikel	0	0	0	0	0	5
	2	MV Partikel	+	+	+	+	+	5
C	0	MV Partikel	+	+	+	+		4
D	0	MV RNA	0	0	0	0	0	4
E	0	Tris Puffer	0	0	0	0	0	5
	2	Tris Puffer	0	0	0	0	0	5

+, Fluoreszenz; 0, keine Fluoreszenz.

Erläuterungen, siehe Text.

System aus Xenopus laevis (Gurdon et al., 1971) vergleichbar. Die hier beschriebene Methode ist durch die Größe der Zellen einfach. Die Isolierung und Beladung von Acetabularia Karyoplasten, die eine Größe von ca. 200 μ haben, ist relativ unkompliziert. Durch die spontane Fusion der beladenen Karyoplasten mit Cytoplasten wird eine schädigende Einwirkung fusionsinduzierender Agenzien vermieden. Der Nachweis der Translationsprodukte mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenzmethode erwies sich somit in Vorversuchen als sehr geeignet und könnte in weiteren Experimenten zusätzlich mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese als auch durch Translation der Virus RNA im zellfreien System erfolgen. Die in ihrer qualitativen Aussagekraft limitierten Resultate der Immunfluoreszenz-Methode könnten so vervollständigt werden und Hinweise darauf geben, ob komplette Virusproteine gebildet oder ob lediglich Peptide mit Antigencharakter produziert werden.

4. Diskussion

4.1 Isolierung von Protoplasten

Alle bisher durchgeführten Versuche zur Isolierung von pflanzlichen Protoplasten basierten auf der von Cocking (1960) entwickelten enzymatischen Methode und verwendeten relativ schlecht definierte und kaum gereinigte Gemische von Glykosidasen. Mit Hilfe dieser Präparate wurde ein mehr oder weniger quantitativer Zellwandabbau erreicht. Allerdings erforderte der vollständige

Zellwandabbau Inkubationszeiten von bis zu 48 h, wodurch die Lebensfähigkeit der Protoplasten oftmals wesentlich beeinträchtigt wurde.

Die hier beschriebene Methode zur Isolierung von pflanzlichen Protoplasten unterscheidet sich grundsätzlich von den anderen bisher beschriebenen Methoden dadurch, daß ein hochgereinigtes Enzym verwendet wurde, daß es sich bei diesem Enzym um eine Protease (Papain, EC 3.4.22.2) handelte, und daß die Protoplasten aus Zellen gewonnen wurden, deren Zellwand nach der Enzymbehandlung im wesentlichen erhalten war. Papain spaltet vornehmlich Peptidbindungen, an denen Arginin, Lysin und Phenylalanin beteiligt sind. Demnach ist davon auszugehen, daß die Protoplastenfreisetzung aus "haploiden" Zellen durch den spezifischen Abbau von Zellwandkomponenten eingeleitet wurde. Da der Austritt nur an einer eng umschriebenen Stelle erfolgte und lichtmikroskopisch keine Veränderungen der Zellwandstruktur beobachtet werden konnten, muß angenommen werden, daß die Zellwand an einer präformierten Stelle lediglich aus Proteinbestandteilen aufgebaut ist, die während der enzymatischen Behandlung herausgelöst wurden. Tatsächlich ist bereits früher gezeigt worden, daß die Zellwand von Acetabularia Protein enthält (Paradies et al., 1977, 1978).

Der Vollständigkeit wegen soll noch eine weitere, wenn auch unwahrscheinliche Möglichkeit erwähnt werden, daß nämlich durch Einwirkung von Papain Glykosidasen aktiviert wurden, die zu einem lokalen Zellwandabbau führten.

Der einmal eingeleitete Vorgang führte zum vollständigen Protoplastenaustritt an einer Stelle, ohne daß es eines weiteren Zellwandabbaues bedurfte. Es liegt nahe anzunehmen, daß der in der Zelle vorherrschende osmotische Druck beim Austritt des Protoplasten eine entscheidende Rolle spielte. Die Tatsache, daß der Protoplast auch beim Austritt durch die enzymatisch hergestellte kleine Öffnung ohne zu zerreißen, erhalten blieb, läßt Rückschlüsse auf die Oberflächenbeschaffenheit zu. Obwohl der Protoplast immer nur an einer Stelle austrat, kann nicht ausgeschlossen werden, daß mehrere derartige "Ausgänge" vorhanden waren. Es kann hervorgehoben werden, daß die Verwendung von Papain es nicht nur ermöglicht Protoplasten zu gewinnen, sondern darüber hinaus auch einen Beitrag zu unserem Verständnis vom Aufbau der Zellwand zu leisten.

Da das Aussehen der "haploiden" Zelle an das Rhizoid einer "normalen" Zelle erinnerte, stellt sich die Frage, ob die Stelle des Protoplastenaustritts möglicherweise eine Ansatzstelle für die Stielentwicklung

darstellte, d.h. daß die Zellwand an dieser Stelle für die Stielentwicklung präformiert war. Dafür könnte auch sprechen, daß in der sehr frühen Entwicklungsphase, d.h. ca. 2-3 Wochen nach dem Schwärmen der Gameten, die "haploiden" Zellen eine gewisse Ähnlichkeit mit "normalen" Keimlingen insofern aufwiesen, daß sie Ansätze zur Stielbildung zeigten. Das Cytoplasma war dabei meist im "Rhizoid" kontrahiert, manchmal auch an einer Stelle des Stieles. Es ist jedoch nie beobachtet worden, daß sich diese Zellen normal weiterentwickelten. Es entstanden letztlich immer sphärisch geformte Zellen. Es könnte also sein, daß der Stielansatz degenerierte und nur das Rhizoid ausgebildet wurde.

Die Anwendung proteolytischer Enzyme zur Protoplastenisolierung beschränkt sich bislang auf "haploide" Zellen von Acetabularia. Ob diese damit einen Sonderfall darstellen, oder ob die Verwendung derartiger Enzyme auch bei anderen Objekten sinnvoll sein könnte, muß Gegenstand weiterer Versuche sein. Unter Umständen wäre diese Methode auch für die Isolierung von Protoplasten aus höheren Pflanzen interessant. Dadurch könnten sowohl die Inkubationszeiten herabgesetzt, als auch schädigende Einflüsse durch wenig gereinigte Enzympräparate vermieden werden. Die Möglichkeit, daß Protoplasten freigesetzt

wurden, ohne daß ein vollständiger Zellwandabbau vorausging, scheint nicht auf Acetabularia beschränkt zu sein. Auch bei der Isolierung von Protoplasten aus anderen Algen wie Micrasterias und Chlorella (Berliner et al., 1976, 1977), Enteromorpha (Millner et al., 1979) und Nitella (Kuroda, 1980) konnte beobachtet werden, daß der Protoplast ohne einen vollständigen Abbau der Zellwand nur an einer, möglicherweise präformierten Stelle, austrat. In diesen Fällen erfolgte die Protoplastenisolierung mit Hilfe von Zellulase, Zellulysin oder Driselase. Die Anwendung dieser Enzympräparate führte jedoch bei Acetabularia zu keinem Protoplastenaustritt.

Die Papainbehandlung ist in der Tat eine sehr schonende Methode. Das ergibt sich auch daraus, daß die Protoplasten ungefähr gleich große metabolische und photosynthetische Aktivitäten aufwiesen wie intakte "haploide" Zellen. Dies wurde durch Inkorporation von ^{35}S -Methionin und $^{14}\text{CO}_2$ belegt. Hinzu kommt, daß die Zeitspanne, in der die Protoplasten isoliert und aus dem Isolationsmedium entfernt werden konnten, sehr kurz war, daß also eine schädigende Einwirkung des Enzyms auf die Protoplastenmembran weitgehend reduziert wurde. Bei der Isolierung von Protoplasten aus höheren Pflanzen wird die Lebensfähigkeit der Protoplasten oftmals durch die

verwendeten Enzyme und die lange Inkubationszeit beeinträchtigt (Cocking, 1972). Günstig erwies sich außerdem die Größe des Untersuchungsobjektes. So konnten die Zellen während der Inkubation unter dem Lichtmikroskop beobachtet und die isolierten Protoplasten sogleich mittels einer Mikropipette in neues Medium überführt werden.

Im Gegensatz zur enzymatischen Isolierung von Protoplasten aus "haploiden" Zellen können Cytoplasten und Karyoplasten aus "normalen" Acetabularia-Zellen auf mechanischem Weg isoliert werden. Von Gibor (1965) wurden erstmals Cytoplasten aus "normalen" Zellen isoliert. Dabei wurde die Zelle in kleine Fragmente zerschnitten. Das dabei austretende Cytoplasma rundete sich in dem als isotonisch angesehenen 90 ‰ Seewasser zu Cytoplasten ab. In der in dieser Arbeit verwendeten Methode wurden Cytoplasten in 1:1 verdünntem Müller-Medium isoliert. Auf diese Art konnten auch Karyoplasten aus "normalen" Zellen mechanisch isoliert werden. Die Zellfragmente (Protoplasten, Cytoplasten und Karyoplasten) nahmen in dem 1:1 verdünnten Müller-Medium alle die mit der physikalisch geringsten Oberflächenspannung verbundene sphärische Form an. Alle genannten Fragmente waren von einer intakten Plasmamembran umgeben, wodurch eine Fusionierung ermöglicht wurde.

4.2 Fusionierung von Zellfragmenten

Die somatische Zellfusion basiert auf der Beobachtung, daß multinukleäre Zellen vor allem unter pathogenen Bedingungen entstehen können. Die daraufhin durchgeführten in vitro Zellfusionen erfolgten unter Verwendung von pathogenen Viren. Überwiegend wurden solche Zellfusionen mit inaktiviertem Sendai-Virus durchgeführt. Gewisse Probleme bei der Präparation des Virus und die auf bestimmte Zelltypen limitierte Anwendung verhinderten jedoch die Anwendung des Virus in vielen Fällen, vor allem bei der Fusionierung pflanzlicher Protoplasten. Diese wurde erst durch die von Kao und Michayluk (1974) eingeführte PEG-induzierte Fusion möglich. Die PEG-Methode erwies sich später auch zur Fusionierung von tierischen Zellen als geeignet (Pontecorvo, 1975). Obwohl PEG als fusionsinduzierendes Agens eine weite Anwendung erfuhr, wird die Lebensfähigkeit der Fusionsprodukte durch die zur Fusion benötigten hohen Konzentrationen von PEG oftmals vermindert. Vielfach werden Fusionen durch erhöhte Ca^{2+} -Konzentrationen und Temperaturen erreicht. Eine solche Behandlung entspricht am ehesten physiologischen Bedingungen.

Alle bisher beschriebenen Fusionen von Pflanzenzellen gehen von großen Zellpopulationen in der Größenordnung

von 10^6 - 10^7 Zellen aus, so daß die Fusion z.T. unkontrolliert verläuft und geeignete Selektionstechniken für die Fusionsprodukte erforderlich sind. Die Fusionsrate ist limitiert und beträgt maximal 30-40 %.

Im Gegensatz zu den bislang verwendeten Methoden zur Fusionierung von Protoplasten wird hier eine Methode beschrieben, die ohne fusionsinduzierendes Agens spontan erfolgt. Voraussetzung ist lediglich, daß mindestens zwei Fragmente in engen Kontakt gebracht werden. Damit ist die Möglichkeit eines schädigenden Einflusses von fusionsinduzierenden Agenzien auf die Fusionsprodukte ausgeschlossen. Die Fusionierung von Protoplasten erfolgt unter genau kontrollierten Bedingungen, d.h. jeweils zwei Protoplasten können fusioniert werden. Dies wird sowohl durch die Größe der Protoplasten (ca. 0.5 mm Ø) als auch durch die spontane Fusion ermöglicht. Die Fusionsrate ist sehr hoch und beträgt fast 100 %. Die spontane Fusion erwies sich damit als sehr effizient und dadurch, daß keine Fusionsagenzien benötigt wurden, als sehr schonende Methode. Die Fusion von Acetabularia Zellfragmenten erfolgte bei Raumtemperatur in 1:1 verdünntem Müller-Medium, welches sowohl Ca^{2+} (13.5 mM) als auch NO_3^- (1.18 mM) enthielt. Die spontan auftretende Fusion

der Fragmente könnte unter Umständen auf die fusions-induzierende Wirkung von Ca^{2+} zurückgeführt werden, dabei könnte die Plasmamembran der Fragmente bei Raumtemperatur in einem flüssigen Zustand vorliegen. Durch den Ca^{2+} -Gehalt des Mediums würde eine Neutralisation der Membranoberfläche und damit ein Phasenübergang der Lipide in den kristallinen Zustand erfolgen und eine spontane Fusion ermöglicht.

Interessant scheint in diesem Zusammenhang ein Hinweis auf die Temperaturabhängigkeit der Cycloheximid-Empfindlichkeit des circadianen Rhythmus der O_2 -Entwicklung bei Acetabularia zu sein (Karakashian und Schweiger, 1976). Das im Augenblick am ehesten die molekulare Basis des circadianen Rhythmus erklärende Modell geht von einem Zweischnittmechanismus aus, wobei der eine Schritt die Integration eines Polypeptides in eine Membran darstellt. Eine Änderung der Temperatur von 20° auf 25° bewirkt nach diesem Modell den Übergang der Membran von einem kristallinen in einen flüssigen Zustand und damit den Effekt auf die Cycloheximidempfindlichkeit.

Bei Protoplasten von Acetabularia sind intra- und interspezifische Fusionen möglich, ohne daß sich hierbei Unterschiede in der Fusionsbereitschaft zeigten. Für weitergehende genetische Untersuchungen wäre es interessant, durch intergenerische Protoplastenfusion und

Fusion der darin enthaltenden Kerne eine Chromosomen-segregation herbeizuführen und eine Genkartierung durchzuführen. Protoplasten eines mating-type, d.h. Protoplasten aus Zellen einer Zyste lassen sich ebenso fusionieren, wie Protoplasten von unterschiedlichem mating-type. Dies besagt, daß auf diesem Niveau keine Inkompatibilitäten, wie sie zwischen Gameten von gleichsinnigen mating-type bestehen vorhanden sind. Die Monözie bei Acetabularia mit regelmäßigem Überschuß eines Geschlechts spricht für phänotypische Geschlechtsbestimmung (Hämmerling, 1934a). Aufgrund der physiologischen Diözie der Zysten sollte man annehmen, daß eine Zygotenbildung nur zwischen Gameten von unterschiedlichem mating-type stattfindet. Mating-type Allele kontrollieren bei einer phänotypischen Geschlechtsbestimmung lediglich die ersten Phasen der sexuellen Vermehrung, ohne mit der Karyogamie oder Meiose zu interferieren. So konnte davon ausgegangen werden, daß Protoplasten des gleichen mating-types fusionieren und zu einer normalen Zelle auswachsen. Die Inkompatibilitätsbarriere zwischen Gameten des gleichsinnigen mating-type in Form der Zellwand würde so überwunden werden.

Für Saccharomycopsis lipolytica konnte eine Fusion und Regeneration von Protoplasten des gleichen mating-type

gezeigt werden (Stahl, 1978). Mating-type Allele kontrollieren bei diesem Organismus nur die Gametenagglutination. Obwohl "haploide" Protoplasten von Acetabularia des gleichen mating-type zur Fusion befähigt waren, zeigten sie keine Regenerationsfähigkeit. Die Fusionsprodukte zeigten zwar in sehr beschränktem Umfang Formbildungsvermögen, d.h. sie wiesen nach längerer Kultivierung öfter stielartige Auswüchse auf aber zeigten nie Anzeichen zur Zellwandbildung. Dagegen ist isoliertes Cytoplasma aus sekundärkernhaltigen Hüten zur Zellwandbildung befähigt, d.h. das aus dem Zellverband gelöste Cytoplasma vermag Zysten zu bilden (Werz, 1968). In seltenen Fällen konnte an isolierten Karyoplasten aus "normalen" Zellen die Anlagerung von zellwandähnlichem Material beobachtet werden, jedoch nicht deren vollständige Regeneration. Als Ursache der mangelnden Regenerationsfähigkeit der fusionierten Protoplasten käme in Frage, daß die Zellen, aus denen die Protoplasten stammten, sich in einem zu weit fortgeschrittenen Differenzierungsstadium befanden, um für ein früheres Differenzierungsstadium charakteristische Schritte, vielleicht die Initiation der Zellwandbildung durchführen zu können.

Die verwendeten "haploiden" Zellen entwickelten sich aus hochdifferenzierten und spezialisierten Geschlechtszellen, den Gameten, ohne daß die Gameten zur Zygote fusioniert waren. Es könnte sein, daß, um das gesamte im genetischen Material deponierte Differenzierungsprogramm ablaufen lassen zu können, es im allgemeinen der Zygotenbildung bedarf, die nur durch die sexuelle Fortpflanzung ermöglicht wird. Diese Frage sollte sich experimentell angehen lassen, z.B. indem durch spezifische Substanzen wie mRNA eine normale Morphogenese induziert wird. Dies würde bedeuten, daß jede Zelle grundsätzlich totipotent ist aber daß in den "haploiden" Zellen und in den Protoplasten nur ein Teil des genetischen Materials dem spezifischen Differenzierungsstand entsprechend exprimiert werden kann.

Es ist bisher nicht möglich gewesen, aus hochdifferenzierten somatischen tierischen und menschlichen Zellen, z.B. Mensch-Maus-Hybride zu züchten. Auch blieben Regenerationsversuche von Fusionsprodukten aus pflanzlichen und tierischen Zellen erfolglos (Davey, 1978). Eine Regeneration von höheren Pflanzenprotoplasten ist dagegen aufgrund des vollständig exprimierbaren genetischen Materials (Totipotenz) der verwendeten somatischen Zellen möglich. Die Regeneration von Pflanzen aus Protoplasten ist demnach ein Indikator für die Totipotenz der verwendeten Zellen.

Die sich bei höheren Pflanzen mit der Fusionstechnik ergebenden Möglichkeiten zur Züchtung geno- und phänotypisch ausgewählter Pflanzen sind für die Pflanzen-genetik (Gleba, 1978; Gleba et al., 1978; Cove, 1979) und in Verbindung mit konventionellen Zuchtmethoden möglicherweise auch für die Pflanzenzüchtung von Bedeutung (Wittwer, 1974; Melchers, 1977; Gamborg et al., 1978; Wenzel, 1980). Bei höheren Pflanzen ist die Aufzucht von haploiden Organismen seit den Versuchen von Guha und Maheshwari (1964, 1966) aus nicht ausdifferenziertem Pollen möglich. Analog dazu könnte angenommen werden, daß, wenn man die generative Phase nach der Meiose unterbricht, damit die Gameten-differenzierung unterbunden und die Entwicklung haploider Zellen von Acetabularia ermöglicht wird. Diese Zellen sollten dann in der Lage sein, ihr genetisches Material vollständig zu exprimieren. Eine solche Unterbrechung der generativen Phase könnte durch Isolierung des sekundärkernhaltigen Hutcytoplasmas erreicht werden (Werz, 1968). Hier eröffnet sich unter Umständen die Möglichkeit, durch Isolierung von Protoplasten aus den auf diese Art gewonnenen haploiden Zellen und Fusionierung dieser Protoplasten zu regenerationsfähigen Acetabularia-Protoplasten zu kommen. Dies würde die Aufzucht von homozygoten Zellen

als auch von Mutanten erlauben.

Die Fusionierung von Cytoplasten aus Zellen von verschiedenen Acetabularia-Arten erfolgt auf die gleiche Weise wie die Fusionierung von Protoplasten. Ebenso ist die Fusionierung von Karyoplasten mit anderen Acetabularia-Zellfragmenten möglich, wobei sich hierbei zusätzlich die Möglichkeit ergibt, Karyoplasten durch Mikroinjektion mit spezifischen Molekülen zu beladen (Cairns et al., 1978a, b, c) und die Karyoplasten anschließend mit Cytoplasten zu fusionieren.

Das Acetabularia System ist dabei prinzipiell dem Oocyten System vergleichbar, in dem durch Injektion von mRNA die Synthese von Hämoglobin induziert werden konnte (Gurdon et al., 1971).

Die Fusions- und Mikroinjektionsmethode reiht sich damit in das Spektrum zellbiologischer Techniken ein.

Die von Hämmerling eingeführten Transplantations- und Implantationsexperimente belegten in eindrucksvoller Weise die Rolle der Kern-Cytoplasma-Wechselbeziehungen. Die Postulierung morphogenetischer Substanzen und ihre mögliche Identität mit mRNA bedeuteten einen großen Fortschritt auf dem Weg, Differenzierungsschritte auf molekularer Ebene zu erklären (Hämmerling, 1963; Brachet, 1968; Kloppstech und Schweiger, 1975, 1976). Es wäre jetzt jedoch notwendig,

experimentell die Möglichkeit zu demonstrieren, artspezifische Morphogenese in Protoplasten oder nicht wachsenden Mittelfragmenten von Acetabularia durch Injektion von mRNA zu induzieren. Durch Injektion von Mengovirus RNA, TMV-RNA und Adenovirus Typ 2 DNA in isolierte diploide Karyoplasten und anschließender Fusion der Karyoplasten mit Cytoplasten konnte die Translation der injizierten Nukleinsäuren in Acetabularia Cytoplasma nachgewiesen werden (Cairns et al., 1978a, b, c). Diese Experimente unterstützen unter anderem die bestehende Annahme, daß der Proteinsyntheseapparat in Form von Enzymen und Ribosomen prinzipiell zwischen Tier- und Pflanzenreich austauschbar ist. Um Differenzierungsvorgänge aufzuklären, wäre es interessant, durch Anwendung der Mikroinjektions- und Fusionstechnik zeitlich unterschiedliche Translation der verschiedenen mRNA's aufzuzeigen. Dies könnte besonders gut mit Acetabularia mRNA durchgeführt werden, da Differenzierung und Fortpflanzung bei Acetabularia in einer Zelle ablaufen.

Demnach können Karyoplasten analog zu Liposomen als Überträger spezifischer genetischer Information Verwendung finden (Kulka und Loyter, 1979; Furusawa, 1980). Die biologische Aktivität von Nukleinsäuren kann so am lebenden System analysiert werden, welches im Gegensatz zu zellfreien Systemen höhere Aussagekraft hat.

Die Entwicklung der Fusionsmethode führt demnach zu einem System, in dem durch Verwendung spezifischer Vektoren und spezifischer Nukleinsäuren biologische Prozesse analysiert werden können (Baserga, 1980). In Erweiterung der Experimente wäre es interessant, durch Injektion von mRNA in "haploide" Kerne art-spezifische Morphogenese zu induzieren. In Implantationsexperimenten, in denen "haploide" Kerne aus A. cliftonii in diploide, apikale Stielfragmente von A. mediterranea implantiert wurden, konnte gezeigt werden, daß die "haploiden" Kerne keine morphogenetische Kapazität besitzen. Ein bis zwei cm lange Mittelfragmente, d.h. Zellen, von denen der basale und apikale Teil abgeschnitten wurde, sind morphogenetisch ebenfalls inaktiv. Die Injektion von mRNA aus "normalen" Zellen in "haploide" Kerne und anschließende Implantation dieser Kerne in derartige Mittelfragmente könnte unter Umständen die Identität von mRNA mit Hämmerling's morphogenetischen Substanzen beweisen. Entsprechendes gilt auch für die Fusion derartig injizierter Karyoplasten mit Cytoplasten.

4.3. Versuche zur Fusionierung von isolierten Kernen

Bei den hier beschriebenen Versuchen, isolierte Kerne aus Acetabularia-Zellen in Gegenwart von PEG und Ca^{2+}

zu fusionieren, konnte eine ausgeprägte Agglutination der Kerne gezeigt werden. Die Agglutination, die durch diese fusionsinduzierenden Agenzien bewirkt wurde, führte dazu, daß der Abstand der beiden Membranen stellenweise kleiner als 100 Å war. Damit war eine wichtige Voraussetzung für die Fusion erfüllt.

Die Kernmembran stellt eine Doppelmembran dar und ist von Kernporen durchsetzt, deren Anzahl zellspezifisch ist (Franke, 1977). Um eine Agglutination und Fusion der Kerne zu erreichen, muß die äußere Kernmembran abgelöst werden. Dies konnte mit Triton X-100 erreicht werden, welches in niedrigen Konzentrationen (0.05 - 2.0 %) die äußere Kernmembran ablöst, jedoch während einer kurzen Inkubationszeit (1-2 min) die innere Membran nicht angreift (Frederiks et al., 1978). Dieses gilt auch für Acetabularia-Kerne. Während die äußere Membran vollständig abgelöst wurde, blieb die innere Membran soweit nachweisbar intakt (Abb. 16). Während in den hier beschriebenen Experimenten der erste Schritt auf dem Weg zur Kernfusion, die Agglutination, in überzeugender Weise getan werden konnte, gelang es noch nicht, den zweiten Schritt, die Membranverschmelzung eindeutig nachzuweisen.

Eine Kernfusion würde jedoch für weitergehende Untersuchungen von erheblicher Bedeutung sein. So könnten

sexuelle Inkompatibilitäten umgangen, Inkompatibilitätsmechanismen identifiziert und Differenzierungsmechanismen untersucht werden. Durch Fusion haploider Kerne könnten homozygote Organismen gezüchtet werden, wobei die Möglichkeit besteht, Mutanten aufzuziehen. Die genetische Variabilität könnte so durch Kernfusion spezifisch erhöht oder erniedrigt werden und die damit verbundenen Auswirkungen auf die Zelldifferenzierung analysiert werden.

5. Zusammenfassung

Nach Zystenvereinzelung konnte die Entwicklung von "haploiden" Zellen von Acetabularia induziert werden. Diese Zellen unterschieden sich morphologisch von den normalen diploiden Zellen, indem sie nur sphärische Strukturen bildeten (ca. 0.5 mm Ø) und kein Stielwachstum zeigten.

Protoplasten konnten nach Papainbehandlung dieser Zellen isoliert werden. Die so gewonnenen Protoplasten fusionierten spontan unter kontrollierten Bedingungen.

Cytoplasten und Karyoplasten aus "normalen" Zellen fusionierten unter den gleichen Bedingungen. Es war möglich, mehrere (bis zu 20) Zellfragmente zu einer Einheit zu kombinieren.

Protoplasten aus "haploiden" Zellen des gleichen mating-type zeigten die gleiche Fusionsbereitschaft wie Protoplasten unterschiedlichen mating-type.

Es waren keine die Fusion induzierende Agenzien, wie PEG oder Sendai-Virus notwendig.

Die Protoplasten konnten bis zu vier Wochen kultiviert werden und zeigten in einzelnen Fällen geringes Formbildungsvermögen.

Cytoplasten und "haploide" Zellen wiesen eine ausgeprägte metabolische und photosynthetische Aktivität auf.

Die fusionierten Protoplasten zeigten kein Regenerationsvermögen und bildeten keine Zellwand.

Isolierte Karyoplasten konnten mit artfremdem genetischen Material injiziert werden, und nach Fusion mit Cytoplasten konnte die Translation der injizierten Makromoleküle im Acetabularia Cytoplasma nachgewiesen werden.

Isolierte Kerne konnten mit PEG und Ca^{2+} stark agglutiniert aber bislang nicht fusioniert werden.

6. Liste der Abkürzungen

DSC	- Differential scanning calorimetry
EDTA-Na ₂	- Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt
ESR	- Electron spin resonance
bis-MSB	- p-bis-(o-methylstyryl)-benzene
NMR	- Nuclear magnetic resonance
PEG	- Polyethyleneglycol
PPO	- 2,5-diphenyloxazole
TES	- N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2- aminoethane sulfonic acid
TMV	- Tobacco mosaic virus
TRIS	- Tris(hydroxymethyl)aminomethane

7. Literaturverzeichnis

Ahkong, Q.F., Fischer, D., Tampion, W. and Lucy, J.A.
(1973)

The fusion of erythrocytes by fatty acids, esters,
retinol and alpha-tocopherol.

Biochem. J. 136, 147-155.

Anné, J. and Peberdy, J.F. (1976)

Induced fusion of fungal protoplasts following treatment
with polyethyleneglycol.

J. Gen. Microbiol. 92, 413-417.

Apel, K. and Schweiger, H.G. (1972)

Nuclear dependency of chloroplast proteins in
Acetabularia.

Eur. J. Biochem. 25, 229-238.

Arnon, D.J. (1949)

Copper enzymes in isolated chloroplasts.

Polyphenoloxidase in Beta vulgaris.

Plant Physiol. 24, 1-15.

Bajaj, Y.P.S. (1977)

Protoplast isolation, culture and somatic hybridization.

Pages 467-496. In: J. Reinert und Y.P.S. Bajaj, eds.

Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue,
and Organ Culture. Springer Verlag, Berlin.

Barski, G., Sorieul, S. et Cornefert, F. (1960)

Production dans des cultures in vitro de deux souches
cellulaires en association, de cellules de caractère
"hybride".

C.R. Heb d. Séances. Acad. Sci. Ser. D. 251, 1825-1827.

Barski, G. (1970)

Cell association and somatic cell hybridization.

Int. Rev. Exp. Pathol. 9, 151-190.

de Bary, A. (1859)

Die Mycetozoen. Ein Beitrag zur Kenntis der niedersten Thiere.

Z. Wiss. Zool. 10, 88-175.

Baserga, R. (1980)

Introduction of RNA and proteins into viable mammalian cells. Pages 79-83. In: R. Baserga, C. Croce and G. Rovera, eds. Introduction of macromolecules into viable mammalian cells.

Alan. R. Liss. Inc., New York.

Bergelson, L.D. (1978)

Paramagnetic hydrophilic probes in NMR investigations of membrane systems.

Methods Membr. Biol. 9, 275-335.

Berger, S., Sandakhchiev, L. and Schweiger, H.G. (1974)

Fine structural and biochemical markers of Dasycladaceae.

J. Micros. 19, 89-104.

Berger, S., Niemann, R. and Schweiger, H.G. (1975)

Viability of Acetabularia nucleus after 24 hours in an artificial medium.

Protoplasma 85, 115-118.

Berliner, M.D. and Wenc, K.A. (1976)

Protoplast induction in Micrasterias and Cosmarium.

Protoplasma 89, 389-393.

Berliner, M.D. (1977)

Protoplast induction in Chlorella vulgaris.

Plant Sci. Lett. 9, 201-204.

Biggins, J. (1971)

Protoplasts of algal cells.

Methods Enzymol. 23, 209-211.

Brachet, J. (1968)

Synthesis of macromolecules and morphogenesis in

Acetabularia.

Curr. Top. Dev. Biol. 3, 1-36.

Braun, E. and Aach, H.G. (1975)

Enzymatic degradation of the cell wall of Chlorella.

Planta 126, 181-185.

Cairns, E., Sarkar, S. and Schweiger, H.G. (1978a)

Translation of tobacco mosaic virus RNA in

Acetabularia cell cytoplasm.

Cell Biol. Intern. Rep. 2, 573-578.

Cairns, E., Gschwender, H.H., Primke, M., Yamakawa, M.,

Traub, P. and Schweiger, H.G. (1978b)

Translation of animal virus RNA in the cytoplasm of
a plant cell.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5557-5559.

Cairns, E., Doerfler, W. and Schweiger, H.G. (1978c)

Expression of a DNA animal virus genome in a plant
cell.

FEBS Lett. 96, 295-297.

Chapman, D. (1975)

Phase transitions and fluidity characteristics of
lipids and cell membranes.

Annu. Rev. Biophys. Bioeng. 8, 185-235.

Clément-Metral, J.D. (1976)

Preparation and some properties of protoplasts from the red alga Porphyridium cruentum.

J. Micros. Biol. Cell. 26, 167-172.

Cocking, E.C. (1960)

A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles.

Nature, 187, 962-963.

Cocking, E.C. (1972)

Plant cell protoplasts-isolation and development.

Annu. Rev. Plant Physiol. 23, 29-50.

Cove, D.J. (1979)

The uses of isolated protoplasts in plant genetics.

Heredity 43, 295-314.

Dacey, M.R., Clothier, R.H., Balls, M. and Cocking, E.C. (1978)

An ultrastructural study of the fusion of cultured amphibian cells with higher plant protoplasts.

Protoplasma 96, 157-172.

Davidson, R. (1969)

Regulation of melanin synthesis in mammalian cells, as studied by somatic hybridization. III. A method of increasing the frequency of cell fusion.

Exp. Cell Res. 55, 424-426.

Enders, J.F. and Peebles, T.C. (1954)

Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 86, 277-286.

Ephrussi, B. et Sorieul, S. (1962)

Nouvelles observations sur l'hybridation in vitro de cellules de souris.

C.R. Hebd. Séances. Acad. Sci. Ser. D. 254, 181-185.

Faber, K. (1893)

The part played by giant cells in phagocytosis.

J. Pathol. Bacteriol. 1, 349-358.

Frank, H. und Kirberger, E. (1950)

Eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung der "wahren Glucose" und Galactose in 0.05 cm³ Blut.

Biochem. Z. 320, 359-367.

Franke, W.W. (1977)

Structure and function of nuclear membranes.

Biochem. Soc. Symp. 42, 125-135.

Frederiks, W.M., James, J., Arnouts, C. Broekhoven, S. and Morreau, J. (1978)

The influence of Triton X-100 on the nuclear envelope of the isolated liver cell nuclei.

Cytobiologie 18, 254-271.

Frei, E. and Preston, R.D. (1968)

Non-cellulosic structural polysaccharides in algal cell walls.

Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 169, 127-145.

Furusawa, M. (1980)

Cellular microinjection by cell fusion: technique and applications in biology and medicine.

Int. Rev. Cytol. 62, 29-67.

Gamborg, O.L., Kartha, K.K. and Ohyama, K. (1978)
Protoplasts and tissue culture methods in crop plant
improvement. Pages 265-271. In: anonymus, ed. Proceedings
of the Symposium of Plant Tissue Culture. Science Press,
Peking.

Gibor, A. (1965)
Surviving cytoplasts in vitro.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54, 1527-1531.

Gleba, Y.Y. and Hoffmann, F. (1978)
Hybrid cell lines Arabidopsis thaliana + Brassica
campestris: no evidence for specific chromosome
elimination.
Mol. Gen. Genet. 165, 257-264

Gleba, Y.Y. (1978)
Extranuclear inheritance investigated by somatic
hybridization. Pages 95-102. In: T.A. Thorpe, ed.
Frontiers of Plant Tissue Culture. International
Association for Plant Tissue Culture. University of
Calgary, Calgary, Alberta, Canada.

Goss, S.J. (1978)
Gene Mapping by Cell Fusion
Int. Rev. Cytol. Suppl. 8, 127-169.

Green, B.R. (1976)
Abnormal cells resulting from asexual reproduction
in Acetabularia (Chlorophyceae, Siphonales).
Phycologia 15, 161-164.

Guha, S., Maheshwari, S.C. (1964)
In vitro production of embryos from anthers of
Datura.
Nature 204, 497.

Guha, S. and Maheshwari, S.C. (1966)

Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of Datura in vitro.

Nature 212, 97-98.

Gurdon, J.B., Lane, C.D., Woodland, H.R. and Marbaix, G. (1971)

Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells.

Nature 233, 177-182.

Haberlandt, G. (1902)

Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen.

Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Classe.

CXI. Band, Abtheilung 1, Heft I bis X, Wien, S.69-91.

Hämmerling, J. (1931)

Entwicklung und Formbildungsvermögen von Acetabularia mediterranea. I. Die normale Entwicklung.

Biol. Zentralbl. 51, 633-647.

Hämmerling, J. (1932a)

Entwicklung und Formbildungsvermögen von Acetabularia mediterranea. II. Das Formbildungsvermögen kernhaltiger und kernloser Teilstücke.

Biol. Zentralbl. 52, 42-61.

Hämmerling, J. (1932b)

Entwicklung und Regeneration bei Acetabularia mediterranea.

Z. Indukt. Abstammungs. Vererbungs1. 62, 92-93.

Hämmerling, J. (1934a)

Über die Geschlechtsverhältnisse von Acetabularia mediterranea und Acetabularia wettsteinii.

Arch. Protistenkd. 83, 57-97.

Hämmerling, J. (1934b)

Über formbildende Substanzen bei Acetabularia mediterranea, ihre räumliche und zeitliche Verteilung und ihre Herkunft.

Wilhelm Roux'Arch. Entwicklungsmech. Org. 131, 1-81.

Hämmerling, J. (1934c)

Regenerationsversuche an kernhaltigen und kernlosen Zellteilen von Acetabularia wettsteinii.

Biol. Zentralbl. 54, 651-665.

Hämmerling, J. (1935)

Über Genomwirkungen und Formbildungsfähigkeit bei Acetabularia.

Wilhelm Roux'Arch. Entwicklungsmech. Org. 132, 424-462.

Hämmerling, J. (1943)

Ein- und zweikernige Transplantate zwischen Acetabularia mediterranea und A. crenulata.

Z. Indukt. Abstammungs- u. Vererbungslehre. 81, 114-180.

Hämmerling, J. (1955)

Neuere Versuche über Polarität und Differenzierung bei Acetabularia.

Biol. Zentralbl. 74, 545-554.

Hämmerling, J. (1963)

Nucleo-cytoplasmic interactions in Acetabularia and other cells.

Annu. Rev. Plant. Physiol. 14, 65-92.

Harris, H. and Watkins, J.F. (1965)

Hybrid cells derived from mouse and man: artificial heterokaryons of mammalian cells from different species.

Nature 205, 640-646.

Harris, H. (1970)

Cell Fusion.

Clarendon Press, Oxford.

Harris, H. (1972)

Cell fusion and the analysis of malignancy.

Nat. Cancer Inst. Monogr. 52, 239-253.

Hartmann, J.X., Kao, K.N., Gamborg, O.L. and Miller, R.A.
(1973)

Immunological methods for the agglutination of protoplasts
from cell suspension cultures of different genera.

Planta 112, 45-56.

Hauser, H. and Phillips, M.C. (1979)

Interactions of the polar groups of phospholipid bilayer
membranes.

Prog. Surf. Membr. Sci. 13, 297-413.

Henle, G., Deinhardt, F. and Girardi, A. (1954)

Cytolytic effects of mumps virus in tissue cultures
of epithelial cells.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 87, 386-393.

Herth, W., Kuppel, A. and Franke, W.W. (1975)

Cellulose in Acetabularia cyst walls.

J. Ultrastruct. Res. 50, 289-292.

Iriki, Y. and Miwa, T. (1960)

Chemical nature of the cell wall of the green algae

Codium, Acetabularia, and Halicoryne.

Nature 185, 178-179.

Johnson, R.T. and Rao, P.N. (1970)

Mammalian cell fusion. Induction of premature chromosome
condensation in interphase nuclei.

Nature 226, 717-722.

Kao, K.N. and Michayluk, M.R. (1974)

A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts.

Planta 115, 355-367.

Karakashian, M.W. and Schweiger, H.G. (1976)

Temperature dependence of cycloheximide-sensitive phase of circadian cycle in Acetabularia mediterranea.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3216-3219.

Keegstra, K., Talmadge, K.W., Bauer, W.D. and

Albersheim, P. (1973)

The structure of plant cell walls.

Plant Physiol. 51, 188-196.

Keller, W.A. and Melchers, G. (1973)

The effect of high pH and calcium on tobacco leaf protoplast fusion.

Z. Naturforsch. 28 c, 737-741.

Klercker, J. (1892)

Eine Methode zur Isolierung lebender Protoplasten.

Öfvers. Vetensk. Akad. Forh. Stockholm 9, 463-471.

Kloppstech, K. and Schweiger, H.G. (1972)

Nuclear dependency of chloroplast ribosomal proteins in Acetabularia. Pages 127-133. In: S. Bonotto,

R. Gouttier, R. Kirchmann, Maisin, J.R., eds.

Biology and Radiobiology of Anucleate Systems.

Academic Press, New York.

Kloppstech, K. and Schweiger, H.G. (1973)

80S ribosomes from Acetabularia.

Biochim. Biophys. Acta 324, 365-374.

Kloppstech, K. and Schweiger, H.G. (1975)

Polyadenylated RNA from Acetabularia.

Differentiation 4, 115-123.

Kloppstech, K. and Schweiger, H.G. (1976)

In vitro translation of poly(A) RNA from Acetabularia.

Cytobiologie 13, 394-400.

Krauss, E. (1884)

Beiträge zur Riesenzellenbildung in epithelialen Geweben.

Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med. 95, 249-272.

Kulka, R.G. and Loyter, A. (1979)

The use of fusion methods for the microinjection of animal cells.

Curr. Top. Membr. Transp. 12, 365-430.

Kuroda, K. (1980)

Giant protoplasts from Nitella cells.

Cell Biol. Intern. Rep. 4, 195-199.

Küster, E. (1909)

Über die Verschmelzung nackter Protoplasten.

Ber. Dtsch. Bot. Ges. 27, 589-598.

Lambert, R.A. (1912)

The production of foreign body giant cells in vitro.

J. Exp. Med. 15, 510-515.

Langhans, T. (1868)

Über Riesenzellen mit wandständigen Kernen in Tuberkeln und die fibröse Form des Tuberkels.

Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med. 42, 382-404.

Langhans, T. (1870)

Beobachtungen über Resorption der Extravasate und
Pigmentbildung in denselben.

Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med.
49, 66-126.

Littlefield, J.W. (1964)

Selection of hybrids from matings of fibroblasts in
vitro and their presumed recombinants.

Science, N.Y. 145, 709-710.

Luginbühl, D. (1873)

Der Micrococcus der Variola.

Arbeiten aus dem Berner Pathologischen Institut
1871, 159-169.

Mabrey, S. and Sturtevant, J.M. (1978)

High-sensitivity differential scanning calorimetry
in the study of biomembranes and related model
systems.

Methods Membr. Biol. 9, 237-274.

Marchant, H.J. and Fowke, L.C. (1977)

Preparation, culture, and regeneration of protoplasts
from filamentous green algae.

Can. J. Bot. 55, 3080-3086.

Marston, R.Q. (1958)

Cytopathogenic effects of haemadsorption virus Type I.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 98, 853-856.

Melchers, G. (1977)

Kombination somatischer und konventioneller Genetik
für die Pflanzenzüchtung.

Naturwissenschaften 64, 184-194.

Melchior, D.L. and Steim, J.M. (1976)

Thermotropic transitions in biomembranes.

Annu. Rev. Biophys. Bioeng. 5, 205-238.

Melchior, D.L. and Steim, J.M. (1979)

Lipid-associated thermal events in biomembranes.

Progr. Surf. Membr. Sci. 13, 211-296.

Michel, W. (1937)

Über die experimentelle Fusion pflanzlicher Protoplasten.

Arch. Exp. Zellforsch. 20, 230-252.

Millner, P.A., Callow, M.E. and Evans, L.V. (1979)

Preparation of protoplasts from the green alga

Enteromorpha intestinalis (L.) Link.

Planta 147, 174-177.

Muller, L.L. and Jacks, T.J. (1975)

Rapid chemical dehydration of samples for electron microscopic examinations.

J. Histochem. Cytochem. 23, 107-110.

Müller, J. (1838)

Über den feineren Bau und die Formen der krankhaften Geschwülste.

Verlag G. Reimer, Berlin.

Müller, M. (1962)

Über jahres- und lunarperiodische Erscheinungen bei einigen Braunalgen.

Bot. Mar. 4, 140-155.

Okada, Y. (1958)

The fusion of Ehrlich ascites tumor cells caused by HVJ virus in vitro.

Biken J. 1, 103-110.

Okada, Y. (1962)

Analysis of giant polynuclear cell formation caused by HVJ virus from Ehrlich ascites tumor cells.

Exp. Cell Res. 26, 98-107.

Overbeek, J. Th. G. (1952)

Electrochemistry of the double layer. Pages 115-193.

In: H.R. Kruyt, ed. Colloid Science, Vol. 1. Elsevier Publishing Company, Amsterdam.

Papahadjopoulos, D. (1978)

Calcium-induced phase changes and fusion in natural and model membranes. Pages 765-790. In: G. Poste, G.L. Nicolson, eds. Cell Surface Reviews, Vol. 5. North-Holland, Publishing Company, Amsterdam.

Paradies, H.H., Göke, L. and Werz, G. (1977)

On the spatial structure of a plant cell wall protein. Secondary structure of a cell wall protein from Acetabularia.

Protoplasma 93, 249-265.

Paradies, H.H. and Werz, G. (1978)

Solution properties of a cell wall protein from Acetabularia (Polyphysa) cliftonii.

Protoplasma 93, 443-461.

Parker, B.C. and Leeper, G.F. (1969)

Fine structure of polysaccharide microcrystals.

Planta 87, 86-94.

Peberdy, J.F., Rose, A.H., Rogers, H.J. and Cocking, E.C. (1976)

Microbial and plant protoplasts.

Academic Press, New York.

Pontecorvo, G. (1975)

Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethyleneglycol treatment.

Somat. Cell Genet. 1, 397-400.

Poste, G. and Pasternak, C.A. (1978)

Virus-induced cell fusion. Pages 305-367. In: G. Poste, G.L. Nicolson, eds. Cell Surface Reviews, Vol. 5.

North-Holland Publishing Company, Amsterdam.

Power, J.B. and Cocking, E.C. (1969)

A simple method for the isolation of very large numbers of leaf protoplasts by using mixtures of cellulase and pectinase.

Biochem. J. 111, 33 P.

Power, J.B., Cummings, S.E. and Cocking, E.C. (1970)

Fusion of isolated plant protoplasts.

Nature 225, 1016-1018.

Power, J.B. and Cocking, E.C. (1971)

Fusion of plant protoplasts.

Sci. Prog., Oxf., 59, 181-198.

Prescott, D.M. (1976)

The cell cycle and the control of cellular reproduction.

Adv. Genet. 18, 99-177.

Preston, R.D. (1974)

The Physical Biology of Plant Cell Walls.

Chapman and Hall, London.

Primke, M., Berger, S. and Schweiger, H.G. (1978)

Protoplasts from Acetabularia: Isolation and fusion.

Cytobiologie 16, 375-380.

Rao, P.N. and Johnson, R.T. (1972)

Cell fusion and its application to studies on the regulation of the cell cycle.

Methods Cell Physiol. 5, 75-126.

Reuter, W. und Schweiger, H.G. (1969)

Kernkontrollierte Lactatdehydrogenase in Acetabularia.
Protoplasma 68, 357-368.

Richter, G. (1959)

Die Auswirkungen der Zellkernentfernung auf die Synthese von RNS und Cytoplasma-Proteinen bei Acetabularia mediterranea.

Biochim. Biophys. Acta 34, 407-419.

Robin, C. (1849)

Sur l'existence de deux espèces nouvelles d'éléments anatomiques qui se trouvent dans le canal médullaire des os.

C.R. Séances. Soc. Biol. Fil. 149-150.

Rokitansky, C. (1855)

Lehrbuch der pathologischen Anatomie.
Verlag Braunmüller, Wien.

Schweiger, E., Wallraff, H.G. und Schweiger, H.G. (1964)

Über tagesperiodische Schwankungen der Sauerstoffbilanz kernhaltiger und kernloser Acetabularia mediterranea.
Z. Naturforsch. 19 b, 499-505.

Schweiger, H.G. (1966)

Activity of ribonuclease in Acetabularia.
Planta 68, 247-255.

Schweiger, H.G. (1969a)

Cell biology of Acetabularia.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 50, 1-36.

Schweiger, H.G. and Berger, S. (1979)

Nucleocytoplasmic interrelationships in Acetabularia and some other Dasycladaceae.

Int. Rev. Cytol., Suppl. 9, 11-44.

Schweiger, H.G., Master, R.W.P. and Werz, G. (1967)

Nuclear control of a cytoplasmic enzyme in Acetabularia.
Nature 216, 554-557.

Schweiger, H.G., Werz, G. und Reuter, W. (1969b)

Tochtergeneration von heterologen Implantaten bei Acetabularia.

Protoplasma 68, 351-356.

Schweiger, H.G., Dehm, P. and Berger, S. (1977)

Culture conditions for Acetabularia. Pages 319-330.

In: C.L.F. Woodcock, ed., Progress in Acetabularia Research. Academic Press, New York.

Seiler, A. (1977)

Galaktomannanabbau in keimenden Johannisbrotssamen (Ceratonia siliqua L).

Planta 134, 209-221.

Shoeman, R.L. (1978)

The occurrence and translation of stable messenger ribonucleoprotein complexes in the cytoplasm of Acetabularia mediterranea.

Ph.D. Thesis, University of Oklahoma, Graduate College, Norman, Oklahoma, USA.

Sietsma, J.H., Eveleigh, D.E. and Haskins, R.H. (1968)

The purification of cellulase and exo-laminaranase and their role in the formation of Pythium sp. "protoplasts".
Antonie van Leeuwenhoek 34, 331-340.

Singer, S.J. and Nicolson, G.L. (1972)

The fluid mosaic model of the structure of cell membranes.

Science 175, 720-731.

Singer, S.J. (1977)

The fluid mosaic model of membrane structure.

Pages 443-461. In: S. Abrahamsson, J. Pascher, eds.

Structure of Biological Membranes. Plenum Press, New York.

Smyth, D.G. (1967)

Techniques in enzymic hydrolysis.

Methods Enzymol. 11, 214-231.

Stahl, U. (1978)

Zygote formation and recombination between like mating types in the yeast Saccharomycopsis lipolytica by protoplast fusion.

Mol. Gen. Genet. 160, 111-113.

Thomas, E., King, P.J. and Potrykus, J. (1979)

Improvement of crop plants via single cells in vitro - an assessment.

Z. Pflanzenzücht. 82, 1-30.

Townsend, Ch.O. (1897)

Der Einfluß des Zellkernes auf die Bildung der Zellhaut.

Jahrb. wiss. Bot. 30, 484-510.

Träuble, H. and Eibl, H. (1974)

Electrostatic effects on lipid phase transitions: membrane structure and ionic environment.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 214-219.

Villarroya, H. and Petek, F. (1976)

Purification and properties of a β -mannanase from alfalfa seeds.

Biochim. Biophys. Acta 438, 200-211.

Virchow, R. (1858)

Reizung und Reizbarkeit.

Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol. 14, 1-63.

Warthin, A.S. (1931)

Occurrence of numerous large giant cells in the tonsils and pharyngeal mucosa in the prodromal stage of measles.

Arch. Pathol. 11, 864-874.

Watkins, J.F. (1971)

Cell fusion in the study of tumor cells.

Int. Rev. Exp. Pathol. 10, 115-141.

Weigert, C. (1874)

Anatomische Beiträge zur Lehre von den Pocken.

Breslau, zitiert bei Krauss (1884)

Wenzel, G. (1980)

Protoplast techniques incorporated into applied breeding programs. Pages 327-340. In: L. Ferenczy, G.L. Farkas, D. Dudits, eds. Advances in Protoplast Research.

Akademiai Kiadó, Budapest.

Werz, G. (1964)

Unterschiede in der Zusammensetzung von Mannanen aus verschiedenen Dasycladaceen-Arten.

Planta 60, 540-542.

Werz, G. (1968)

Differenzierung und Zellwandbildung in isoliertem
Cytoplasma aus Acetabularia.
Protoplasma 65, 349-357.

Wilschut, J. and Papahadjopoulos, D. (1979)

Ca²⁺-induced fusion of phospholipid vesicles monitored
by mixing of aqueous contents.
Nature 281, 690-692.

Wittwer, S.H. (1974)

Maximum production capacity of food crops.
BioScience 24, 216-224.

Yanishevsky, R.M. and Prescott, D.M. (1978)

Late S phase cells (Chinese hamster ovary) induce
early S phase DNA labeling patterns in G1 phase nuclei.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3307-3311.

Zetsche, K. (1967)

Unterschiedliche Zusammensetzung von Stiel- und Hut-
zellwand bei Acetabularia mediterranea.
Planta 76, 326-334.

Danksagung

Die Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Zellbiologie in Ladenburg in der Abteilung Schweiger durchgeführt.

Herrn Professor Hans-Georg Schweiger danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes am Institut, für hilfreiche Diskussionen während der Durchführung der Versuche und für das fortdauernde Interesse an der Arbeit.

Frau Professor Gertrud Rehner danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Frau Dr. Sigrid Berger danke ich für die Hilfe bei der Herstellung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen und für die Überlassung der Abbildungen Nr. 3, 4, 12 und 13.

Ferner danke ich allen, deren Interesse und Unterstützung das Zustandekommen der Arbeit erleichterte.

Die Durchführung der Experimente wurde durch eine finanzielle Unterstützung der Max-Planck-Gesellschaft ermöglicht.

Curriculum vitae

10. 3. 1949 geboren in Woldegk/Neubrandenburg
als Tochter der Eheleute Karl-Heinz
und Ruth Primke, geborene Asmus.
- 1955 - 1967 Grund- und Realschule
- 1967 - 1972 Fachhochschule für Hauswirtschaft
und Ernährung in Hamburg.
- 1972 - 1975 Studium der Ernährungswissenschaften
an der Justus-Liebig-Universität in
Giessen.
Diplom-Prüfung zum
Diplom-Oecotrophologen September 1975.
- 1977 - 1980 Anfertigung der Doktorarbeit im
Max-Planck-Institut für Zellbiologie
zuerst in Wilhelmshaven und später
in Ladenburg.

